

# **Bacteriocine in *Streptococcus pneumoniae***

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur  
Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte  
Dissertation

von

Dipl.-Biol. Thomas Lux

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05. September 2008

Vorsitzender: Professor Dr. John Cullum

1. Berichterstatter: Professor Dr. Regine Hakenbeck

2. Berichterstatter: Professor Dr. Matthias Hahn

Kaiserslautern, 2008

D 386

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Kaiserslautern, im Juli 2008.

.....  
Thomas Lux

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Thomas Michael Lux  
Geburtsdatum: 05.08.1975  
Geburtsort: Dudweiler (Saar)

## AKADEMISCHER WERDEGANG

Seit 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich  
Biowissenschaften der Universität Exeter  
2002 – 2008 Promotion im Fachbereich Mikrobiologie der TU  
Kaiserslautern  
Thema der Promotion: **Bacteriocine in *S. pneumoniae***  
1999 – 2000 Wissenschaftlicher Hilfsmitarbeiter am Institut für  
Biotechnologie und Wirkstoffforschung, Kaiserslautern  
1996 – 2002 Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern mit Abschluss  
Diplom in Mikrobiologie  
Thema der Diplomarbeit: **Konstruktion einer Deletion im  
*pnc*-Cluster bacteriocin-produzierender *S. pneumoniae*-  
Stämme**

## SCHULISCHER WERDEGANG

1982 – 1986: Grundschule am Stiefel, St. Ingbert - Rentrisch  
1986 – 1992: Albertus-Magnus-Realschule, St. Ingbert  
1992 – 1996: Albertus-Magnus-Gymnasium, St. Ingbert

## SONSTIGE AUSBILDUNGEN

2006 – 2007 Business English course with integrated internship abroad  
(Fulltime) European Language Certificates (Certificate  
English *Level B2*)

Exeter, den 06/09/2008

## **Zusammenfassung der Dissertation „Bacteriocine in *S. pneumoniae*“**

In dieser Arbeit konnte durch ein Assay-System, das ausgehend von publizierten Methoden für *S. pneumoniae* adaptiert wurde, eine inter- und intraspezies Inhibierung anderer Stämme nachgewiesen werden. Dies gilt für die zwei *S. pneumoniae* TIGR4 und R6 in denen Bacteriocingene beschrieben waren ebenso, wie für Vertreter global verbreiteter Isolate verschiedener Serotypen und unterschiedlicher klonaler Zugehörigkeit.

Da bei den verschiedenen Stämmen Unterschiede in der Hemmstärke und im Wirkspektrum beobachtet wurden, wurde sowohl das die Bacteriocingene enthaltene *pnc*-Cluster, wie auch das *spi*-Regulationscluster einiger Stämme sequenziert und genauer analysiert. Einige der im *pnc*-Cluster von *S. pneumoniae* identifizierten ORFs ließen sich anhand der Merkmale ihrer Genprodukte zu Bacteriocinen der Klasse IIb zu ordnen. Sie besitzen alle gut konservierte Leader-Peptide, variieren jedoch in der AS-Sequenz und im pI ihrer Propeptide. Des Weiteren befinden sich Gene für Immunitätsproteine, Membranproteine, IS-Elemente, CAAX-Proteasen und hypothetische Proteine in den untersuchten *pnc*-Clustern. Das *spi*-Cluster zeigte bereits in vorhergehenden Versuchen Einfluss auf die Regulation der stromabwärts gelegenen Gene des *pnc*-Clusters (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000). Es ließen sich z.T. Unterschiede in den AS-Sequenzen der Histidinkinase SpiH, dem ABC-Transporter SpiABCD und dem Peptidpheromon SpiP zwischen den untersuchten Stämmen erkennen. Damit ließ sich die Selektivität des QS-Regulationsmechanismus, wie er bereits beschrieben wurde, erklären (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000).

Die Bedeutung des *spi*-TCS, des SpiABCD-Transporter und der CAAX-Protease für Regulation, Produktion und Immunität der Bacteriocinproduktion konnte durch Mutationsanalyse am Beispiel von *S. pneumoniae* 2306 nachgewiesen werden. Offensichtlich existieren im Stamm *S. pneumoniae* 2306 jedoch noch andere Bacteriocingene außerhalb des *pnc*-Clusters, die u.a. auf Grund fehlender genomischer Information nicht identifiziert werden konnten.

Die biologische Bedeutung der Bacteriocinproduktion ist vermutlich im Konkurrenzkampf um ökologische Nischen, bzw. Steigerung von möglichen DNA-Rekombinationsereignissen in natürlich kompetenten Streptokokkenspezies durch erhöhte Freisetzung von DNA verwandter Arten zu sehen.

Als ein besonders starker Bacteriocinproduzent mit einem breiten Wirkspektrum stellte sich *S. pneumoniae* 632 heraus. Dies könnte auf einen Zusammenhang mit der globalen Verbreitung hindeuten und stellt somit einen interessanten Aspekt für weitere Forschungen dar.

## **Danksagungen**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. M. Hahn danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Cullum danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Peter Reichmann für die kompetente wissenschaftliche Betreuung, für die vielen wertvollen Anregungen, die kritische Durchsicht des Manuskripts und die unendliche Geduld.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie danken, die während der ganzen Zeit hilfreiche und freundliche Bank- und Officenachbarn gewesen sind und so eine hervorragende Atmosphäre, auch neben der wissenschaftlichen Arbeit, ermöglicht haben. Allen voran Jens Rutschmann für unzählige Avatare und Wortspiele.

Meinen Eltern möchte ich für die ständige Unterstützung danken. Und für alles alles andere.

...not that there's anything wrong with that (Jerry Seinfeld)



## Inhalt

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
1.2 Pathogenitätsfaktoren .....	6
1.3 Zwei-Komponenten-Systeme, Quorum sensing und genetische Kompetenz .....	8
1.4 Bacteriocine .....	12
1.5 Biofilme und Bacteriocinproduktion in <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	16
1.6 Zielsetzung .....	19
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Bakterienstämme .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Streptokokken-Stämme.....	20
2.1.2 <i>E. coli</i> -Stämme .....	21
2.1.3 Bakterienstämme anderer Gattungen.....	21
<b>2.2 Plasmide und Oligonukleotidprimer .....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Plasmide .....	21
2.2.2 Oligonukleotidprimer.....	22
<b>2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen .....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Medienzusätze und Antibiotika .....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Zentrifugen und Rotoren.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung.....</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Stammkonservierung .....</b>	<b>30</b>
<b>2.8 Mikroskopische Untersuchungen.....</b>	<b>30</b>
<b>2.9 Polymerase-Chain-Reaction (PCR) .....</b>	<b>30</b>
2.9.1 PCR mit Goldstar Polymerase.....	31
2.9.2 Long Range-PCR .....	32
2.9.3 Real-Time PCR .....	33
2.9.4 RNA-Isolierung aus <i>S. pneumoniae</i> .....	34
2.9.5 Reverse Transkription von cDNA / Durchführung der RT-PCR.....	34
<b>2.10 DNA-Techniken .....</b>	<b>36</b>
2.10.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i> .....	36
2.10.2 Glykogen/Ethanol-Präzipitation.....	36
2.10.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion .....	37
2.10.4 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	37
2.10.5 Verdau durch Restriktionsenzyme.....	38
2.10.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase .....	38
2.10.7 Vektorligation.....	39
2.10.8 Elektrophorese und Nachweis von DNA.....	39
2.10.9 DNA-Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	40
2.10.10 Herstellung von Zell-Lysaten.....	41
2.10.11 Aufreinigung amplifizierter oder ligierter DNA-Fragmente .....	41
<b>2.11 Klonierungstechniken .....</b>	<b>42</b>
2.11.1 Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	42
2.11.2 Blau/Weiß-Selektion.....	43
2.11.3 Transformation .....	43
<b>2.12 Sequenzierung .....</b>	<b>46</b>
2.12.1 Grundlage und Durchführung der Sequenzierungsreaktionen .....	46
2.12.2 Analyse der DNA-Sequenzen .....	49
<b>2.13 Klonierungsstrategien .....</b>	<b>49</b>
2.13.1 Darstellung des Plasmids pGEM-ASB zur Deletion der <i>pnc</i> -Gene.....	49
2.13.2 Darstellung der Plasmide pJDR1, pJDB2 und pJDO3 .....	55



2.14 Bacteriocin-Assay .....	56
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
3.1 Bacteriocinproduktion .....	59
3.1.1 Bacteriocinproduktion in <i>S. pneumoniae</i> R6 und <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 .....	59
3.1.2 Screening nach bacteriocinproduzierenden Streptokokken.....	61
3.1.3 Auswirkungen der Veränderungen der Wachstumsbedingungen auf die Bacteriocinproduktion .....	64
3.2 Wirkspektren der produzierten Bacteriocine .....	66
3.3 Analyse der sequenzierten Genomabschnitte.....	70
3.3.1 Übersicht über die Bacteriocin-Cluster.....	70
3.3.2 Analyse des <i>spi</i> - und <i>pnc</i> -Clusters von <i>S. pneumoniae</i> 628.....	71
3.3.3 Analyse von <i>S. pneumoniae</i> 632 und <i>S. pneumoniae</i> F4 .....	71
3.3.4 Analyse des <i>spi</i> -Clusters von <i>S. pneumoniae</i> 2306.....	73
3.3.5 Bacteriocingene .....	78
3.3.6 Immunitätsgene .....	82
3.3.7 CAAX-Proteasen.....	83
3.3.8 Hypothetische Proteine .....	84
3.4 Konstruktion von Mutanten in <i>S. pneumoniae</i> 2306.....	86
3.4.1 Transformation der Plasmide in <i>S. pneumoniae</i> 2306 .....	86
3.5 Bacteriocin-Platten-Assay der <i>S. pneumoniae</i> 2306 Transformanten.....	87
3.5.1 <i>S. pneumoniae</i> 2306 Mutanten als Produzenten.....	87
3.5.2 Wirkspektrum der <i>S. pneumoniae</i> 2306 Mutanten.....	89
3.5.3 <i>S. pneumoniae</i> 2306 Mutanten als Indikatorbakterien.....	90
3.6 Identifizierung eines Bacteriocin-ähnlichen Gens in <i>S. pneumoniae</i> 2306 außerhalb des Bacteriocin-Clusters .....	92
3.7 Einfluss des Peptidpheromons SpiP auf das Wachstum .....	94
3.8 Expressionsanalyse der Bacteriocingene durch RT-PCR .....	96
3.8.1 Bacteriocingenexpression in nicht induzierten <i>S. pneumoniae</i> 2306 Zellen.....	97
3.8.2 Bacteriocingenexpression in induzierten <i>S. pneumoniae</i> 2306 Zellen .....	99
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>103</b>
4.1 Auswirkungen der Veränderungen der Wachstumsbedingungen auf die Bacteriocinproduktion .....	103
4.2 Konstruktion von Mutanten in <i>S. pneumoniae</i> 2306.....	104
4.3 Das <i>pnc</i> -Cluster und die Bacteriocinproduktion von <i>S. pneumoniae</i> .....	105
4.4 Unterschiede der <i>pnc</i> - und <i>spi</i> -Cluster verschiedener Stämme von <i>S. pneumoniae</i> ..	107
4.5 Ein funktionelles <i>spi</i> -Cluster ist für eine Bacteriocinproduktion und Immunität entscheidend.....	110
4.6 Der positive Bacteriocinphänotyp der Mutante <i>S. pneumoniae</i> 2306 $\Delta$ <i>pncR-K</i> .....	111
4.7 Wirkspektren der produzierten Bacteriocine und Vorteile einer Bacteriocinproduktion .....	112
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>114</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>130</b>
A. Nukleotidsequenz-Alignments .....	131
A1 <i>S. pneumoniae</i> 628 gegen <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 .....	131
A2 <i>S. pneumoniae</i> 632 gegen <i>S. pneumoniae</i> F4 .....	141
B. Identifizierte Genprodukte in den sequenzierten DNA-Abschnitten .....	146
B1. Homologien der abgeleiteten Peptidsequenzen aller ORFs des Stammes <i>S.</i> <i>pneumoniae</i> 2306 zu <i>S. pneumoniae</i> R6 und TIGR4. ....	146
B2. Übersicht der identifizierten open reading frames.....	147
B2.1 <i>S. pneumoniae</i> R6.....	147
B2.2 <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 .....	148

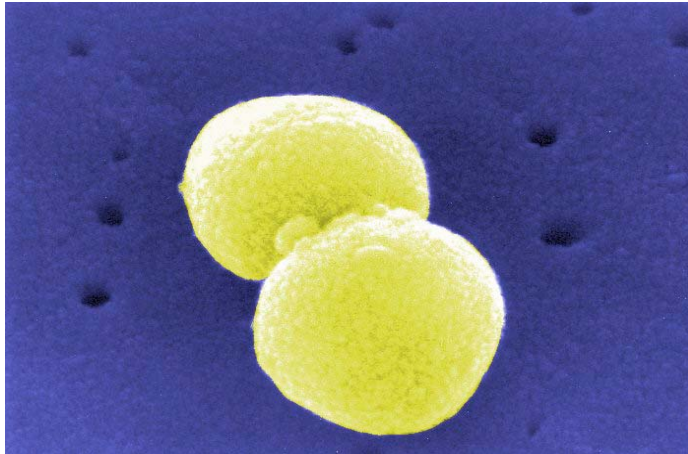
B2.3 <i>S. pneumoniae</i> 628.....	149
B2.4 <i>S. pneumoniae</i> F4 .....	150
B2.5 <i>S. pneumoniae</i> 632.....	150
B2.6 <i>S. pneumoniae</i> Hu15.....	151
B2.7 <i>S. pneumoniae</i> 2306 .....	152
<b>C. Sonstiges .....</b>	<b>153</b>
C1. Abkürzungen.....	153
C2. Verwendete Chemikalien .....	153

# 1. Einleitung

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation und Produktion von Bacteriocinen in dem humanpathogenen Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. In den folgenden Abschnitten werden zunächst der Organismus und dessen Virulenzfaktoren beschrieben, danach wird auf die molekularen Details von Regulationssystemen, die für die Bacteriocinproduktion wichtig sind, eingegangen. Abschließend werden Bacteriocine und die biologischen Aspekte ihrer Produktion besprochen.

*Streptococcus pneumoniae* ist ein Gram-positives, Katalase-negatives, kokkenförmiges Bakterium. Es wächst bevorzugt in kurzen Ketten oder in Paaren, weshalb es früher den Namen *Diplococcus pneumoniae* trug. Es wurde 1881 innerhalb weniger Monate von zwei bedeutenden Bakteriologen Sternberg und Pasteur unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben. Phylogenetisch gehört *S. pneumoniae* zur Familie der *Streptococcaceae* (Ordnung: Lactobacillales, Klasse: Bacilli, Abteilung Firmicutes), bzw. den nichtsporulierenden, Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt (ca. 40 %). Die ca. 1 µm durchmessenden Einzelzellen gewinnen Energie hauptsächlich über den homofermentativen Stoffwechselweg. Als Hauptendprodukt fällt bei der Kohlehydratvergärung Milchsäure (Lactat) an, weswegen das Bakterium stoffwechselphysiologisch zu den Milchsäurebakterien zählt. *S. pneumoniae* ist ein aerotoleranter Anaerobier (mikroaerophil), der Sauerstoff metabolisch nicht verwerten kann, aber in normaler Atmosphäre wächst.



**Abbildung 1.** Pneumokokken im Raster-Scanning-Mikroskop (Quelle: Public Health Image Library, <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>, ID# 263, Foto: Janice Carr).

Im Menschen ist *S. pneumoniae* auf den Schleimhäuten des Nasen- und Rachenraumes und auf der Bindehaut des Auges als Kommensale zu finden.

Die Pneumokokken-Zellen sind von einer dicken Polysaccharidkapsel umgeben. Bei Kultivierung auf Blutagar entwickeln sich schleimig aussehende Kolonien („S“ - Form; s = smooth/glatt). Kapsellose Mutanten bilden Kolonien mit rauer Oberfläche („R“ - Form; r = rough/rau).

Im Jahr 1944 isolierte Oswald Avery DNA, RNA und Proteine aus Zellen eines S-Stammes und mischte sie getrennt voneinander mit lebenden Bakterien eines R-Stammes. Nur bei der Zugabe von DNA entwickelten sich in der Kultur nicht nur Bakterien des R-, sondern auch des S-Stammes. In einem weiteren Experiment fügte er der DNA noch DNAase hinzu, ein Enzym, welches DNA zersetzt. Hier entwickelten sich wiederum nur Bakterien des R-Stammes. Avery zeigte so mit Hilfe einfacher Experimente, dass die DNA Träger der Erbinformation ist (Avery *et al.*, 1944).

Als klassische Verfahren zur Differenzierung der einzelnen Arten dienen vor allem serologische Methoden. Aufgrund des Hämolyseverfahrens von Streptokokken auf Blutagar unterschied Brown bereits 1919 drei verschiedene Ausprägungen:

- $\alpha$ -Hämolyse – „Vergrünung“ des Medium um die Kolonien, die auf der Freisetzung von Peroxid beruht, wodurch das Hämoglobin zu Methämoglobin reduziert wird, während die Erythrocytenmembranen weitgehend intakt bleiben, z. B. bei *S. pneumoniae*.

- $\beta$ -Hämolyse – scharf begrenzte Zone vollständiger Klärung um die Kolonien aufgrund der Auflösung der Erythrocyten und Abbau des Blutfarbstoffes durch Hämolsine.
- $\gamma$ -Hämolyse – keine Veränderung des Blutagars, d.h. nicht-hämolysierend.

Neben der Unterteilung nach der Art ihrer Hämolyse können Streptokokken anhand ihrer Zellwandpolysaccharide unterschieden werden, die als Antigene wirksam sind. Im Jahr 1993 teilte Rebecca C. Lancefield die Streptokokken in serologische Gruppen A bis V ein (Lancefield, 1933).

Eine weitere Klassifizierung von *S. pneumoniae* erfolgt aufgrund des Fehlens von identifizierbaren Antigenen durch die chemische Feinstruktur der Kapselpolysaccharide in bisher 90 Serotypen (Bentley *et al.*, 2006) (McCullers & Tuomanen, 2001). Des Weiteren werden Optochin-Sensitivität und Galle-Löslichkeit als Identifikationskriterium für *S. pneumoniae* benutzt.

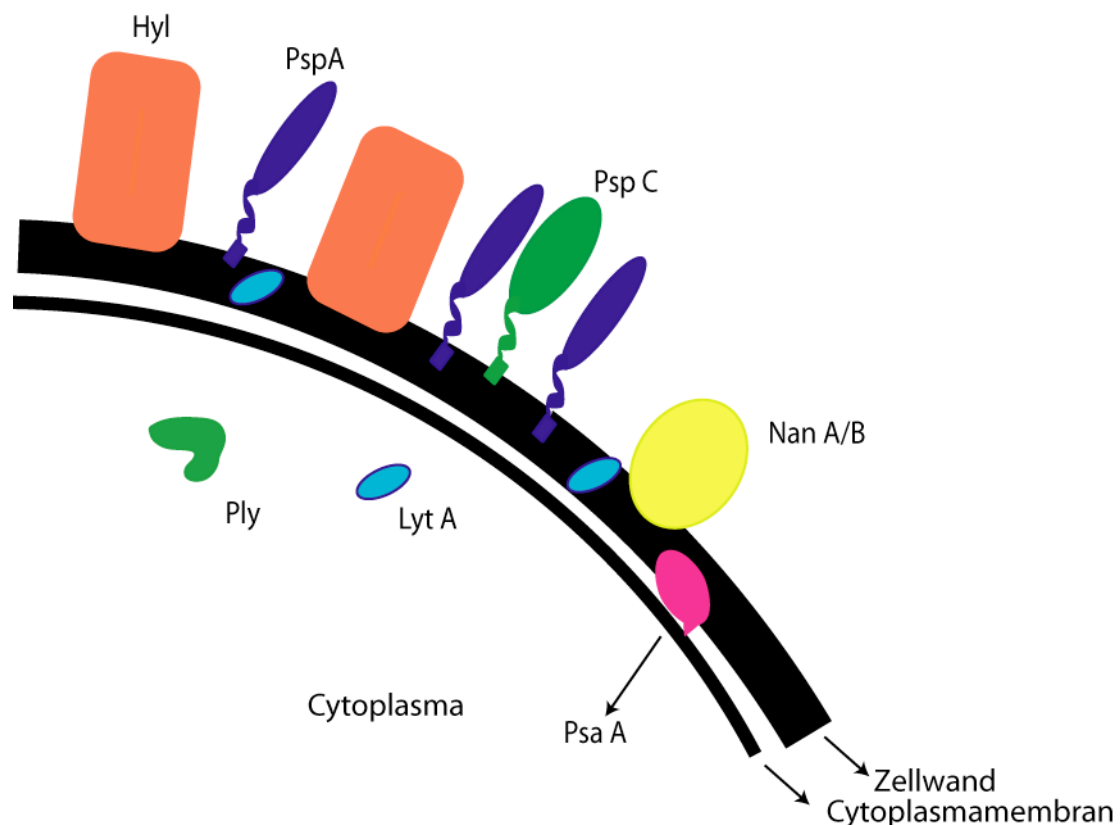
## 1.2 Pathogenitätsfaktoren

Eine Pneumokokkeninfektion äußert sich als Lungenentzündung, Mittelohrentzündung, Meningitis oder Bakteriämie (McCullers & Tuomanen, 2001). Die Sterberate ist bei Menschen mit bereits geschwächtem Immunsystem, kleinen Kindern bis zu 2 Jahren und älteren Menschen besonders hoch. Trotz der Therapiemöglichkeiten durch eine Vielzahl von Antibiotika (hauptsächlich  $\beta$ -Lactame) und zwei Impfstoffen, sterben jährlich weltweit ca. 5 Millionen Kinder unter 5 Jahren an einer Pneumokokkeninfektion, sowie ca. 1 Million Erwachsene weltweit (Klein, 1999; Mulholland, 1999). In den USA zählt die Lungenentzündung zu den zehn häufigsten Todesursachen (Musher, 1992).

Wichtige Pathogenitätsfaktoren sind (Jedrzejewski, 2001):

- Die **Polysaccharidkapsel** schützt das Bakterium vor der Phagocytose durch das Immunsystem.
- Die **Hyaluronat-Lyase** (Hyl) erleichtert die Infektion des Wirtes durch Abbau der extrazellulären Matrix des Gewebes (Lock *et al.*, 1988a; Lock *et al.*, 1988b).
- Das **Pneumolysin** (Ply) wirkt direkt auf die Immunabwehr des Wirtes (Bonev *et al.*, 2001; Feldman *et al.*, 1992).

- Das **Autolysin** (LytA) bewirkt die Lyse der Pneumokokken während der stationären Phase, was die Freisetzung von Pneumolysin bewirkt (Lock *et al.*, 1988a; Lock *et al.*, 1988b).
- Das **Pneumococcal Surface Antigen** (PsaA) (Sampson *et al.*, 1994).
- Das **Pneumococcal Surface Protein** (PspA) (McDaniel *et al.*, 1991).
- Zwei **Neuraminidasen** (NanA/NanB) schädigen die Zellen des Wirtes durch Spaltung von Oberflächen-Glukanen (Lock *et al.*, 1988b).



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der Anordnung der Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* auf der Zelloberfläche, der Zellwand oder im Cytoplasma. Die Hyaluronat-Lyase (Hyl), das Pneumococcal Surface Protein (PspA), das Pneumococcal Surface Antigen (PsaA), die beiden Neuraminidasen (NanA/NanB), sowie das Autolysin (LytA) und das Pneumolysin (Ply) im Cytoplasma.

Als Hauptpathogenitätsfaktor gilt die das Bakterium umhüllende hydrophile Polysaccharidkapsel. Sie schützt das Bakterium vor der Phagocytose durch das Immunsystem des Wirtes.

Die Polysaccharidkapsel bildet die Grundlage zur Herstellung von Impfstoffen. Bisher wurden zwei Arten von Impfstoffen entwickelt. Ein Impfstoff (Pneumovax 23, Behring) enthält als Antigen 23 Kapselpolysaccharide, der Serotypen 1 bis 5, 6B, 7F,

8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F und 33F. Das entspricht 85 bis 90 % der infektiösen Serotypen. Die Schutzwirkung dieses Impfstoffes ist jedoch bei Kleinkindern sehr gering, da sich die Immunglobuline G2 (IgG2), welche die Immunantwort auf Polysaccharide vermitteln, erst im Alter von etwa 2 Jahren entwickeln. Der andere Impfstoff wird von Wyeth-Lederle-Vaccines hergestellt (Jedrzejewski, 2001). Es handelt sich dabei um einen so genannten Konjugat-Impfstoff der neben den Kapselpolysacchariden (4, 6B, 9V, 14, 19F und 23F), einem Oligosaccharid des Serotyps 18C noch eine nichttoxische Variante des Diphtherietoxins CRM<sub>197</sub> als Trägerprotein enthält. Dieses erhöht die Effektivität bezüglich der Induktion von Antikörpern, deckt aber weniger Serotypen ab.

Die Problematik bei der Behandlung von Pneumokokkeninfektionen ergibt sich aus der weltweit verstärkt auftretenden Antibiotikaresistenz. Seit den 70-iger Jahren des letzten Jahrhunderts wird eine Zunahme der Penicillin-resistenten Pneumokokken beobachtet. Die Resistenz vermitteln veränderte Penicillin-bindende Proteine (PBP), die an der Biosynthese des Mureins beteiligt sind. Aufgrund dieser Veränderung werden die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika nur mit verminderter Affinität gebunden (Hakenbeck *et al.*, 1980; Handwerker & Tomasz, 1986). Generell wurde ein enger Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Penicillin und dem Auftreten von Resistenzen beobachtet. Ein Vergleich der auftretenden Penicillin-resistenten Pneumokokken ergab, dass in Südafrika, Spanien, Ungarn und Frankreich Klone vor allem des Serotyps 6, 9, 14, 19 und 23 auftraten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich der resistente Serotyp 23F Klon von Spanien nach Frankreich und in die USA ausgebreitet hat (Barnes *et al.*, 1995).

### **1.3 Zwei-Komponenten-Systeme, Quorum sensing und genetische Kompetenz**

Abbildung 3 zeigt den Aufbau und Ablauf eines Quorum sensing-Mechanismus über ein Zwei-Komponenten-System (two-component system, TCS). Der Begriff Quorum sensing (QS) beschreibt das Phänomen der Zelldichte-abhängigen Genexpression, das zum ersten Mal in dem Gram-negativen Bakterium *Vibrio fischeri* (Fuqua *et al.*, 1994; Nealson & Markovitz, 1970; Nealson & Hastings, 1979) beschrieben wurde. Dabei wird die Expressionsrate eines Gens durch Detektion der Konzentration eines spezifischen, extrazellulären Signalmoleküls reguliert. Dieses Signalmolekül dient zur Messung der Populationsdichte einer wachsenden Bakterienkultur und der

Kommunikation der Bakterien untereinander. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Biolumineszenz in *Vibrio fischeri*: Überschreitet die Konzentration des Signalmoleküls aufgrund einer bestimmten Bakteriendichte einen Schwellenwert, kommt es zur Ausbildung von Biolumineszenz. Während die Mehrzahl der Gram-negativen Bakterien mit Hilfe der *N*-Acyl-Homoserin-Lactonen kommuniziert, sind es in Gram-positiven Bakterien die so genannten „autoinducing peptides“ (AIP). Diese Peptide zeigen eine Vielzahl von Strukturen, haben aber einige gemeinsame Merkmale:

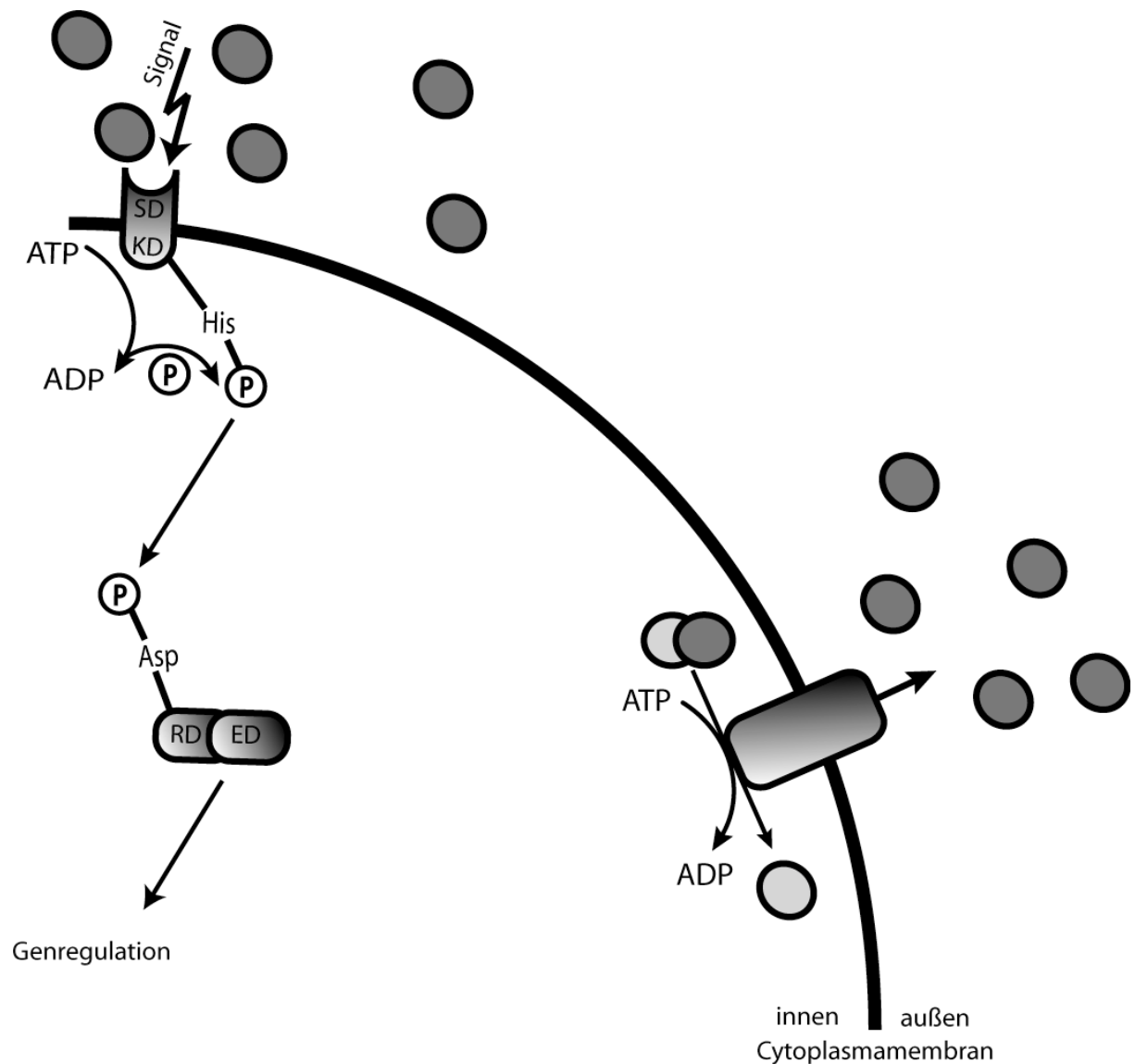
- eine geringe Größe
- sie werden ribosomal synthetisiert
- werden in einigen Fällen durch eine post-translationale Modifikation stabilisiert und aktiviert

Neben den oben genannten Merkmalen lassen sich in den Quorum sensing-Mechanismus Gram-positiver Bakterien alle Elemente eines Zwei-Komponenten-Systems funktionell einbeziehen.

Zwei-Komponenten-Systeme wurden in Archaeabakterien, Pflanzen und niederen Eukaryoten, jedoch nicht in Vertebraten entdeckt. Ein typisches bakterielles Zwei-Komponenten-System besteht aus zwei verschiedenen Proteinen: einem in der Zellmembran verankertes Sensorprotein (Rezeptorhistidinkinase) und ein Regulatorprotein (Responseregulator) im Cytoplasma. Das Sensorprotein ist charakterisiert durch eine C-terminale Kinasedomäne aus ca. 200 Aminosäureresten. Der N-terminale Teil kann variieren und enthält gewöhnlich mehrere Transmembrandomänen. Zwischen dem C-terminalen Membransegment und der Kinasedomäne befindet sich eine oft als Linkerdomäne beschriebene Region.

Bei einem Quorum sensing-Mechanismus eines Gram-positiven Bakteriums wird das AIP über einen ABC-Transporter nach außen transportiert und dabei proteolytisch an einer spezifischen Spaltstelle gespalten. Dieses prozessierte AIP wird von der Sensordomäne des TCS erkannt. Durch das Binden des AIPs an die Sensordomäne wird vermutlich eine Konformationsänderung ausgelöst. Unter ATP Verbrauch wird dadurch ein konservierter Histidin-Rest in der Kinasedomäne der Histidinkinase phosphoryliert. Diese Phosphatgruppe wird auf einen Aspartat-Rest in der N-terminalen Hälfte der Receiverdomäne des Responseregulators übertragen. Der phosphorylierte Responseregulator wirkt als Transkriptionsaktivator/-inhibitor für die Proteine des eigenen Quorum sensing-Mechanismus, sowie weiterer Gene, die über eine passende Regulatorbindestelle innerhalb ihrer Promotorregion verfügen.





**Abbildung 3.** Quorum sensing-Mechanismus bei Gram-positiven Bakterien. Das Peptidpheromon wird durch einen ABC-Transporter an seiner definierten Spaltstelle prozessiert und unter ATP-Verbrauch nach außen transportiert. Dort wird es von der Sensordomäne (SD) eines Zwei-Komponenten-Systems erkannt. Die Kinasedomäne (KD) phosphoryliert einen konservierten Histidin-Rest (His) unter ATP Spaltung. Der Phosphatrest wird auf die Receiverdomäne (RD) eines Responseregulators übertragen, dessen Effektordomäne (ED) weitere Gene reguliert.

Diese Art von Quorum sensing wurde zuerst in *Lactococcus lactis* (Kuipers *et al.*, 1995) und *S. pneumoniae* beschrieben (Havarstein *et al.*, 1995a). Diese Systeme sind bei der Regulation der Bacteriocinproduktion und der genetischen Kompetenz beteiligt.

Mit Hilfe der vollständig Genomsequenzen von *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* TIGR4 (Hoskins *et al.*, 2001; Tettelin *et al.*, 2001) und *S. pneumoniae* D39 (Lanie *et al.*, 2007) konnten bisher 13 Zwei-Komponenten-Systeme, d.h. 13

Responseregulatoren mit zugehöriger Histidinkinase, sowie ein einzelner Responseregulator, entdeckt werden. Bis auf drei konnte allen Systemen einen Zusammenhang bei der Virulenzentwicklung zugeordnet werden (Throup *et al.*, 2000). Die Receiverdomänen können aufgrund von Homologievergleichen in vier Gruppen eingeteilt werden (Lange *et al.*, 1999). Die gleichen Gruppen zeigen sich auch bei einem Vergleich der Outputdomänen. Der molekulare Mechanismus der Phosphorylierung der Outputdomäne läuft zwischen den einzelnen Gruppen unterschiedlich ab.

Quorum sensing bedeutet Regulation in Abhängigkeit von Zelldichte, wobei die Induktion der genetischen Kompetenz von *S. pneumoniae* schon bei relativ geringer Zelldichte einsetzt (Havarstein *et al.*, 1995a). Die genetische Kompetenz ermöglicht *S. pneumoniae* die Aufnahme freier, fremder DNA, und bei ausreichender Homologie zu einer Integration der DNA in das Genom. Dieses führt zu einer höheren Adaptationsfähigkeit an die Umgebung und/oder Vorteilen gegenüber Konkurrenten. Bei *S. pneumoniae* wird die Kompetenz und potentielle Virulenz über ein Peptidgebundenes Quorum sensing-System reguliert. Die beiden Kompetenz-Loci *comAB* und *comCDE* codieren für einen ATP-bindenden Transporter (ComA), ein Hilfsprotein (ComB), das Pheromon CSP (competence stimulating peptide; ComC), sowie eine Histidinkinase (ComD) und einen Responseregulator (ComE). ComAB und ComDE werden in wachsenden Zellen auf einem niedrigen Level exprimiert, was zu einer langsamen Akkumulation von CSP im Wachstumsmedium führt. Wird eine CSP-Konzentration von  $1^{-10}$  ng/ml erreicht, was einer Zelldichte von circa  $10^7$  Zellen pro ml entspricht, wird die genetische Kompetenz induziert (Havarstein *et al.*, 1995a). Die Histidinkinase interagiert mit dem CSP, und überträgt daraufhin eine Phosphatgruppe an den Responseregulator (Havarstein *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996). Der aktivierte Responseregulator wirkt auf Gene, die eine ComE-Bindestelle in ihrer Promotor-Region besitzen (Peterson *et al.*, 2000; Rimini *et al.*, 2000; Ween *et al.*, 1999). Von besonderer Bedeutung ist dabei das Gen *comX*, welches für einen alternativen Sigma-Faktor codiert, für die Transkriptionsaktivierung der so genannten späten Kompetenzgene verantwortlich ist (Lee & Morrison, 1999). Diese Gene vervollständigen das Kompetenz-System um Gene zur Bindung, Prozessierung, Aufnahme und Rekombination von DNA (Campbell *et al.*, 1998).

Obwohl es innerhalb der regulatorischen Gene von Quorum sensing-Systemen, dem N-Terminus, dem Linker-Part der Rezeptorhistidinkinase, den autoinduzierenden Peptiden und Peptidprozessierenden Genen die wenigsten Sequenzübereinstimmungen zwischen Spezies und Stämmen gibt, kann in einigen Fällen das Peptidpheromon von unterschiedlichen Stämmen der gleichen oder verwandten Spezies erkannt werden. Ein Beispiel dafür findet sich in den ComC-Peptiden verschiedener *Streptococcus pneumoniae* Isolaten (Havarstein *et al.*, 1997; Whatmore *et al.*, 1999).

Für eine effiziente DNA-Aufnahme ist es notwendig sicher zustellen, dass sich DNA in unmittelbarer Nähe der Zellen befindet. Kompetente Zellen sind in der Lage mit Hilfe eines Zwei-Peptid-Bacteriocins (CibAB) Altolysis (Guiral *et al.*, 2005) in nicht-kompetenten Zellen derselben Spezies zu induzieren. Dieses benötigt zusätzlich noch das Choline-Bindeprotein D, vermutlich eine Murein Hydrolase (Kausmally *et al.*, 2005; Steinmoen *et al.*, 2002; Steinmoen *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch in *Bacillus subtilis* beobachtet (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003).

## 1.4 Bacteriocine

Bei Bacteriocinen handelt es sich um ribosomal synthetisierte, antibakterielle Peptide prokaryotischen Ursprungs (Tagg *et al.*, 1976).

Hunderte von Peptid-Antibiotika wurden in den letzten 50 Jahren beschrieben und rund 99 % aller Bakterien produzieren mindestens ein Bacteriocin (Klaenhammer, 1988; Riley & Wertz, 2002).

Klaenhammer unterscheidet drei Klassen Bacteriocine (siehe Tabelle 1):

**Tabelle 1.** Klassifizierung von Bacteriocinen von Milchsäurebakterien nach Tagg *et al.*, 1976.

Bacteriocinklasse	Merkmal
Klasse I: Lantibiotika	Typ A: langgestreckte Moleküle Typ B: kugelförmige Moleküle
Klasse II: unmodifizierte hitzestabile Bacteriocine	Unterklasse IIa: Pediocin-artige Bacteriocine (aktiv gegen <i>Listeria</i> ) Unterklasse IIb: Zwei-Peptid Bacteriocine Unterklasse IIc: benötigen reduzierte Cysteinreste für Aktivität
Klasse III: große hitzelabile Bacteriocine	Proteine: Helveticin J <sup>1)</sup> , Enterolysin A <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> (Joerger & Klaenhammer, 1990)

<sup>2)</sup> (Nilsen *et al.*, 2003)

Klasse I, die **Lantibiotika** erfahren eine post-translationale Modifikation, wodurch sie Aminosäuren wie Lanthionin und  $\beta$ -Methyllanthionin, und einige andere dehydratisierte Aminosäuren (AS) enthalten (Guder *et al.*, 2000). Diese Klasse wird weiter in zwei Untergruppen A und B unterteilt, basierend auf Strukturmerkmalen und der Art ihrer Wirkung.

**Typ A Lantibiotika** wirken, indem sie die Cytoplasmamembran der Zielzelle depolarisieren. Sie sind größer als **Typ B Lantibiotika** und besitzen 21 bis 38 Aminosäurereste (AS-Reste). Zu dieser Gruppe gehört auch das am besten untersuchte Bacteriocin Gram-positiver Bakterien das Nisin (Gross & Morell, 1971). Die Bacteriocine des Typs B besitzen eine eher globuläre Sekundärstruktur und ihre Funktion beruht auf Enzymhemmung. Ein Beispiel dafür ist das Mersacidin, welches bei der Zellwandsynthese interagiert (Altena *et al.*, 2000; Brotz *et al.*, 1995; Brotz *et al.*, 1997).

Klasse II Bacteriocine, die **Non-Lantibiotika**, haben eine Größe von 30 bis 60 AS-Reste, sind hitzestabil, besitzen keine Lanthionine und sind bei neutralem pH-Wert positiv geladen. Es lassen sich mehrere Untergruppen unterscheiden.

Die Bacteriocine der größten Gruppe, **Klasse IIa**, besitzen untereinander eine Sequenzhomologie von 40 bis 70 % und ein konserviertes Motiv (YYGNGVX-CXKXXCXV[DN]W[GA]) am N-Terminus, sowie eine Aktivität gegenüber *Listeria*. Wie Typ A Lantibiotika wirken sie durch Porenbildung in der Cytoplasmamembran, indem der C-Terminus eine hydrophobe oder amphiphile Transmembran  $\alpha$ -Helix bildet (Wang *et al.*, 1999). Der konservierte N-Terminus ist im Vergleich mit dem C-Terminus kationischer und hydrophiler. Diese beiden Domänen übernehmen verschiedene Rollen im Wirkmechanismus: der N-Terminus vermittelt die Bindung an das Zielbakterium über geladene AS-Reste, während der hydrophobe/amphiphile C-Terminus in die Membran eindringt, und die Zelle permeabilisiert wird (Chen *et al.*, 1997a; Chen *et al.*, 1997b; Miller *et al.*, 1998). Beispiele hierfür sind Pediocin AcH (Ennahar *et al.*, 1996), Sakacin A (Schillinger & Lucke, 1989) und Leucocin A (Hastings *et al.*, 1991; van Belkum & Stiles, 1995).

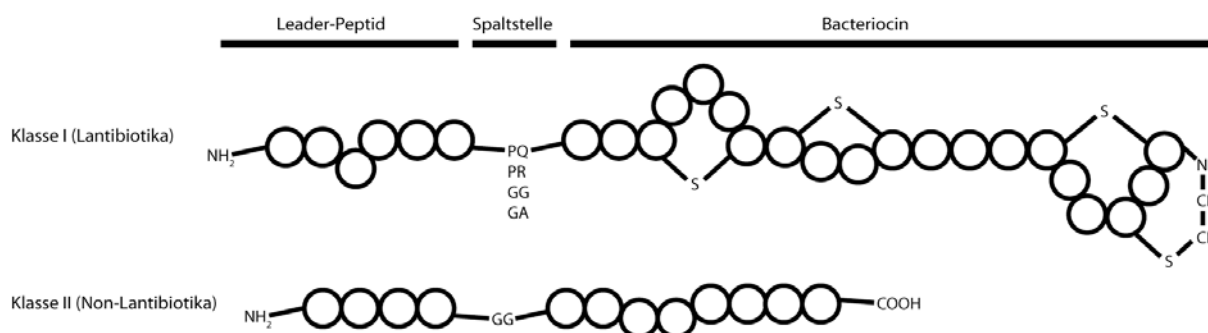
**Klasse IIb** Bacteriocine wie Lactacin F (Muriana & Klaenhammer, 1991a; Muriana & Klaenhammer, 1991b), Lactococcin G (Nissen-Meyer *et al.*, 1992), Plantaricin JK, Plantaricin EF (Diep *et al.*, 1996) oder Thermophilin 13 (Marciset *et al.*, 1997) bilden

Poren in der Membran der Zielzellen, die aus zwei unterschiedlichen Peptiden zusammengesetzt sind. Beide Peptide unterscheiden sich deutlich in ihrer Aminosäuresequenz, was darauf schließen lässt, dass sie phylogenetisch von zwei verschiedenen Bacteriocinen stammen. Dennoch werden zur vollständigen Aktivität beide Peptide benötigt. So besitzen die beiden Peptide  $\alpha$  und  $\beta$ , die das Bacteriocin Lactococcin G bilden, für sich alleine keine antimikrobiologische Aktivität und wirken nur optimal in einem Verhältnis von 1:1 (Moll *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1998). Neben dem Synergieeffekt der beiden Peptide ist ein wichtiges Identifizierungskriterium für Klasse IIb Bacteriocine das Vorhandensein eines einzigen Immunitätsproteins, dessen Gen zusammen mit den Strukturgenen der Bacteriocine in einem Operon organisiert ist (Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

In eine dritte Untergruppe (**IIc**) werden solche Bacteriocine eingeteilt, die reduzierte Cysteinreste für Aktivität benötigen. Als Beispiel dient Lactococcin B (Venema *et al.*, 1993).

Die dritte Klasse (**III**) umfasst große, hitzelabile Proteine, wie z.B. Helveticin J und V (Joerger & Klaenhammer, 1986; Vaughan *et al.*, 1992) und Lactacin B (Barefoot & Klaenhammer, 1984; Barefoot *et al.*, 1994).

Eine zusätzliche Klasse (**IV**) benötigen Lipid- oder Kohlenhydratreste zur Wirksamkeit. Beispiele hierfür sind Leuconocin S (Bruno & Montville, 1993) und Lactocin 27 (Upreti & Hinsdill, 1975).



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung des Aufbaus von Klasse I und Klasse II Bacteriocinen (Prepeptid): Leader-Peptid, Spaltstelle des ABC-Transporters (GG: Glycin-Glycin; PQ: Prolin-Glutamin; PR: Prolin-Arginin; GA: Glycin-Alanin) und das wirksame Bacteriocin (Propeptid).

Bacteriocine werden als Prepeptide (oder Precursor) in der Zelle produziert. Diese bestehen aus einem N-terminalen Leader-Peptid und dem C-terminalen Propeptid, dem eigentlichen Bacteriocin. Zwischen dem Leader-Peptid und dem Propeptid befindet sich eine charakteristische Spaltstelle, die aus zwei Glycinen (GG) bestehen kann. Daneben können noch Prolin-Glutamin (PQ), Prolin-Arginin (PR) oder Glycin-Alanin (GA) (siehe Abb. 4) als Spaltstelle vorkommen. An dieser Spaltstelle wird das Prepeptid proteolytisch gespalten und aktiviert. Innerhalb des Propeptides kann es zu posttranslationalen Modifikationen kommen, welche meistens an Serin-, Threonin- und Cystein-Resten stattfinden.

Die Gene, die für die Modifikationsenzyme codieren, finden sich in der Umgebung der Bacteriocingene. Zusammen mit diesen und Genen für die proteolytische Spaltung, den Transport aus der Zelle, die Immunität gegen das Bacteriocin, sowie Gene für die Regulation der Produktion bilden sie Bacteriocin-Cluster mit mehreren Transkriptionseinheiten.

In der Abfolge von Modifikation und Transport unterscheiden sich Klasse I und Klasse II Bacteriocine. Während Klasse I Bacteriocine (z.B. Nisin, Kuipers *et al.*, 1993) durch zwei Proteine modifiziert, anschließend durch eine Serin-Protease gespalten und dann erst durch einen ABC-Transport exportiert werden, werden Klasse II Bacteriocine (z.B. Mersacidin, Altena *et al.*, 2000) durch ein einzelnes Protein modifiziert und die Prozessierung erfolgt zeitgleich mit dem Export durch einen ABC-Transporter mit zusätzlicher Protease-Domäne (Guder *et al.*, 2000).

Der Wirkungsbereich der Bacteriocine Gram-positiver Bakterien kann stark variieren. Lactococcin A, B und M wirken nur auf verwandtschaftlich nahe stehende Bakterien, also nur gegen andere Lactokokken (Ross *et al.*, 1999). Andere Bacteriocine wirken jedoch in einem außergewöhnlich weiten Bereich. Beispielsweise wirken einige Typ A Lantibiotika wie Nisin A und Mutacin B-Ny266 auf einen sehr weiten Bereich von Organismen, wie *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Microoccus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Mota-Meira *et al.*, 2000; Mota-Meira *et al.*, 2005).

## 1.5 Biofilme und Bacteriocinproduktion in *Streptococcus pneumoniae*

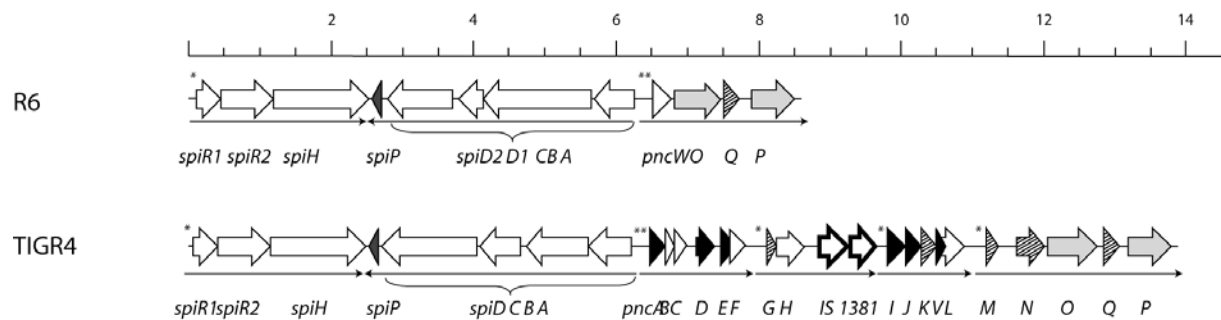
Als Biofilme bezeichnet man dichte Ansammlungen von an Oberflächen haftenden Mikroorganismen, welche in eine Exopolysaccharid-Matrix eingeschlossen sind (Marshall *et al.*, 1989). Das bekannteste Beispiel eines Biofilms ist der Zahnbelag. Bakterien, die in Biofilmen leben, reagieren auf Umweltsignale mit der Expression neuer Phänotypen, die sich von denen planktonischer Zellen unterscheiden. So sind diese bis zu 1000-fach toleranter gegenüber Antibiotika (Hoyle & Costerton, 1991) und die Protein-Expressionsprofile sind gegenüber planktonischen Zellen verschieden (O'Toole *et al.*, 2000). Biofilmbildung wird initiiert durch Interaktionen planktonischer Zellen mit einer Oberfläche.

Bei der Regulation der Genexpression von Bakterien in einem Biofilm sind Quorum sensing-Mechanismen von großer Bedeutung. So wird z.B. durch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden das Wachstum konkurrierender Bakterien kontrolliert, was den produzierenden Organismen einen Vorteil bei der Besiedlung ökologischer Nischen oder bei dem Zugang zu Nährstoffen bringt. So wird während der Biofilmbildung von *S. mutans* die Entwicklung der Kompetenz und der Bacteriocinproduktion (Mutacin VI) durch CSP reguliert und aufeinander abgestimmt (van der Ploeg, 2005). Unterhalb des CSP-Niveaus für die Kompetenzentwicklung stoppt CSP die Zellteilung und induziert den Zelltod *in vitro* (Qi *et al.*, 2005). Kompetenzentwicklung und Bacteriocinproduktion scheinen allgemeingültige Mechanismen für effiziente DNA-Aufnahme benachbarter Stämme (Kreth *et al.*, 2005a) darzustellen und scheinen eine wichtige Rolle bei der Besiedlung und Populationsbalance in Biofilmen oraler Streptokokken zu spielen (Kreth *et al.*, 2005b; Upton *et al.*, 2001).

In *S. pneumoniae* wurde ein Zwei-Komponenten-System entdeckt, in dessen Nachbarschaft sich stromaufwärts ein weiteres Gen-Cluster befindet. Während de Saizieu diese Gene als *blp*-Gene (bacteriocin-like peptide) bezeichnet, wird in dieser Arbeit die Nomenklatur von Reichmann verwendet und die Gene des Zwei-Komponenten-Systems als *spi*- (S. p*pneumoniae* peptide induction), bzw. die des Bacteriocin-Clusters als *pnc*-Gene (pneumococcal bacteriocins) bezeichnet (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000).

Die Gene des Zwei-Komponenten Systems weisen Homologien zu den Genen des *com*-Operon auf, die des *pnc*-Clusters zu Genen, die für Bacteriocin codieren. Eine

Analyse, gestützt durch Microarray-Technologie, zeigte Gene des *pnc*-Clusters auf, die durch ein Bacteriocin-ähnliches Peptid (SpiP) reguliert werden (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000). Somit liegen eine funktionelle Verknüpfung, sowie eine zelldichteabhängige Regulation nahe. Abbildung 5 zeigt die Organisation des *spi*-, sowie des *pnc*-Clusters von *S. pneumoniae* TIGR4 (Serotyp 4) und *S. pneumoniae* R6.



**Abbildung 5.** Organisation der Bacteriocin-Cluster von *S. pneumoniae* TIGR4 (Serotyp 4) und *S. pneumoniae* R6. Die Gene des *pnc*-Clusters sind nur mit Großbuchstaben gekennzeichnet, mit Ausnahme des ersten *pnc*-Genes. Das für das Pheromon SpiP codierende Gen *spiP* ist dunkelgrau. Bacteriocingene mit typischer GG-Spaltstelle sind schwarz. Gene des IS1381-Elementes und verkürzte Derivate sind dick umrandet. Weiß sind hypothetische Gene mit unbekannter Funktion. Hellgrau sind Gene für CAAX-Peptidasen. Schraffierte Gene sind Gene für Immunitätsproteine. Mit \* sind SpiR2-Erkennungsmotive markiert. Dünne Pfeile zeigen Transkriptionseinheiten. Größe ist in kb angegeben.

Zu dem *spi*-TCS von *S. pneumoniae* TIGR4 gehören Gene, die ein Peptidpheromon (SpiP), einen Responseregulator (SpiR), eine Histidinkinase (SpiH) und einen Peptid-Transporter (SpiDCBA) codieren.

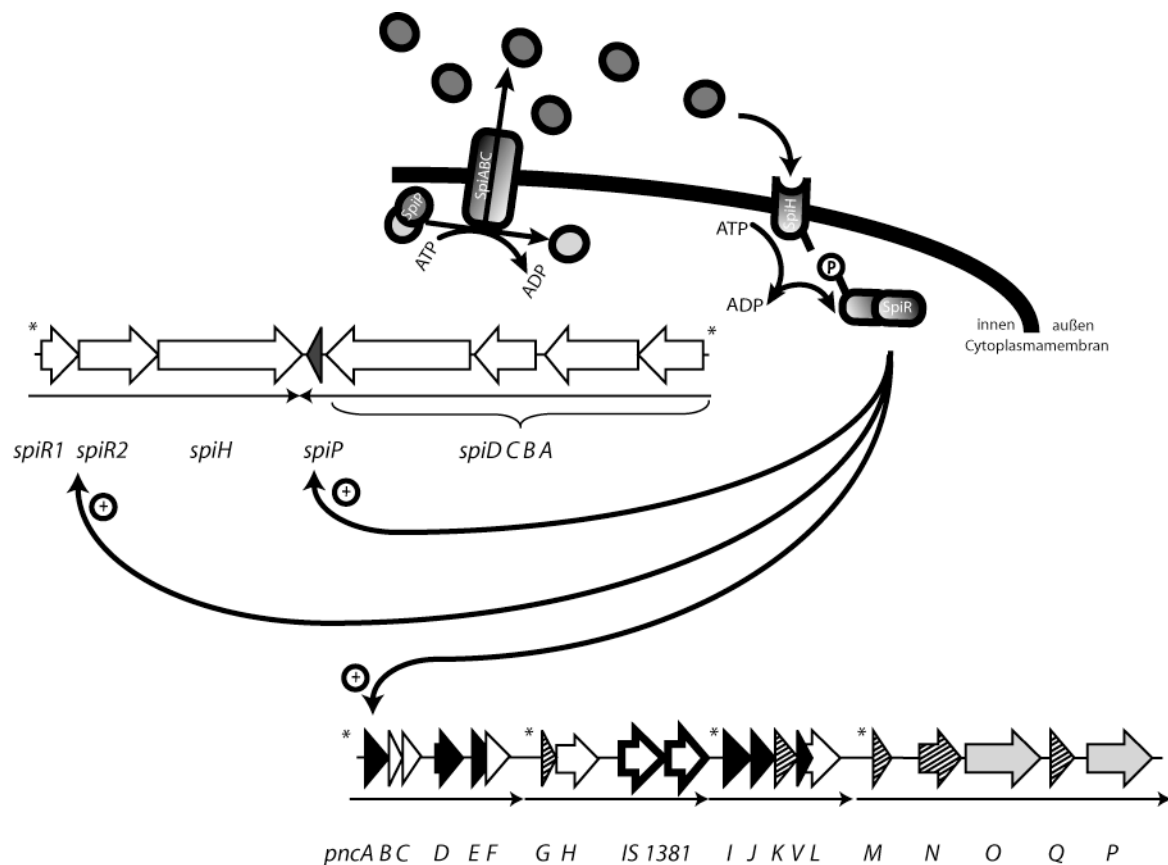
Die Gene *pncA*, *pncD*, *pncE*, *pncI*, *pncJ* und *pncV* des *pnc*-Clusters codieren für Bacteriocine, *pncG*, *pncK*, *pncM*, *pncN* und *pncQ* möglicherweise für Immunitätsproteine, *pncB*, *pncC*, *pncF*, *pncH* und *pncL* codieren Membranprotein mit unbekannter Funktion und *pncO* und *pncP* codieren für Proteasen der CAAX-Familie. Zusätzlich findet man noch ein IS1381-Element, eine Transposase.

Während *S. pneumoniae* TIGR4 ein ca. 8 kb großes *pnc*-Cluster enthält, in welchem sowohl Bacteriocingene, Immunitätsgene und CAAX-Petidase-Gene liegen, besitzt der Stamm R6 nur die Gene *pncWOQP* (siehe Abbildung 5), also keine Gene, die für vermutliche Bacteriocine codieren.

Im Folgenden wird der Regulationsmechanismus kurz erörtert (siehe Abbildung 6, de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000): Das Peptidpheromon, dessen Produktion ausschlaggebend für die Induktion des *spi*-Systems ist, wird von dem



ABC-Transporter SpiABCD an dem GlyGly-Motif prozessiert und ausgeschieden, und reichert sich innerhalb einer bestimmten Wachstumsphase, der frühen stationären Phase, an. Das Pheromon kann nun an den spezifischen Rezeptor, die Histidinkinase SpiH, binden. Die Histidinkinase phosphoryliert unter ATP-Verbrauch die Receiverdomäne des Responseregulators SpiR. Dieser phosphorylierte Responseregulator reguliert neben den Genen, die für die Expression des Peptidpheromons (*spiP*), den ABC-Transporter (*spiABCD*), die Histidinkinase (*spiH*), sowie für den Responseregulator selbst (*spiR1*, *spiR2*) verantwortlich sind auch die Gene des *pnc*-Clusters.



**Abbildung 6.** Darstellung des vermuteten Regulationmechanismus des *pnc*-Clusters durch das *spi*-System am Beispiel von *S. pneumoniae* TIGR4. Das Peptidpheromon SpiP wird von dem ABC-Transporter SpiABCD sekretiert und prozessiert. Zu einer bestimmten Wachstumsphase wird eine Konzentration erreicht, bei der SpiP an die Rezeptordomäne Histidinkinase SpiH, bindet. Dadurch wird eine ATP-abhängige Autophosphorylierung der Histidinkinase induziert, und der Phosphatrest auf die Receiverdomäne des Responseregulators SpiR übertragen. Dieser aktivierte Responseregulator induziert (mit (+) markiert) neben den Genen, die für das Peptidpheromon (*spiP*), den ABC-Transporter (*spiDCBA*), die Histidinkinase (*spiH*), sowie für den Responseregulator selbst codieren (*spiR2*) auch die Gene des *pnc*-Clusters. Legende siehe Abbildung 5.

## 1.6 Zielsetzung

Durch die verfügbaren Genomsequenzen von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 wurde ein Gen-Cluster identifiziert, dessen Genprodukte eine Homologie mit Bacteriocinen der Familie der Non-Lantibiotika aufweisen. Bisher fehlte allerdings der Nachweis für einen Zusammenhang zwischen den Produkten der *pnc*-Gene und ihrer biologischer Aktivität. Dieser Nachweis sollte im Rahmen dieser Dissertation erbracht werden.

Das *pnc*-Clusters enthält mehrere Regulatorbindestellen des sich stromaufwärts befindlichen *spi* Zwei-Komponenten-Systems. Dieses System erfüllt regulatorische Funktionen bei der Produktion der Bacteriocine.

Zunächst wurde ein Assay-System entwickelt, das es ermöglicht eine Bacteriocinproduktion phänotypisch, d.h. durch Wachstumshemmung eines Indikatorstammes, sichtbar zu machen. Mit Hilfe dieses Tests sollten Stämme aus einer Vielzahl klinischer Isolate unterschiedlicher *Streptococcus pneumoniae*-Serotypen getestet und Bacteriocinproduzenten identifiziert werden. Diese Serotypen gehören zu weltweit verbreiteten, hochvirulen *S. pneumoniae*-Stämmen, welche gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika resistent sind. Von den identifizierten Bacteriocinproduzenten sollten Deletions-, oder „loss-of-function“-Mutanten in vermutlich bei der Regulation und Produktion involvierten Genen hergestellt werden, um diese auf Änderungen im Bacteriocinphänotyp zu untersuchen. Es sollten die *pnc*- und/oder *spi*-Cluster verschiedener Isolate sequenziert werden, um im Falle einer Varianz des Phänotyps diese auf eventuelle Unterschiede in der Nukleotidsequenz zurückführen zu können und die Expression einzelner Bacteriocingene mittels Real-Time PCR gemessen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 Streptokokken-Stämme

**Tabelle 2.** In dieser Arbeit verwendete Streptokokken-Stämme.

Stamm	Serotyp	relevanter Genotyp	Referenz
<i>S. pneumoniae</i> R6	-	R36A, Derivat von D39	Hoskins <i>et al.</i> , 2001; Avery <i>et al.</i> , 1944
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	4	Norwegen	Tettelin <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i> 628	9V	Spanien, Spain <sup>9V</sup> -3	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> Hu15	19A	Ungarn, Hungary <sup>19A</sup> -6	Reichmann <i>et al.</i> , 1995
<i>S. pneumoniae</i> 496	19F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 456	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 632	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 637	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 638	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 653	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 667	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 673	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 674	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 677	23F	Spanien, Spain <sup>23F</sup> -1	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> SA16	23F	Südafrika	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> SA17	23F	Südafrika	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> F4	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F10	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F11	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F12	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F13	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F14	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> F15	23F	Frankreich	
<i>S. pneumoniae</i> 2349	23F	Spanien	Reichmann <i>et al.</i> , 1997
<i>S. pneumoniae</i> 2306	23F	Finnland	Sibold <i>et al.</i> , 1992
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>spiR2</i> ::pJDR1	23F	<i>spiR2</i> ::pJDR1 Mutante von 2306	Diese Arbeit
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>spiB</i> ::pJDB2	23F	<i>spiB</i> ::pJDB2 Mutante von 2306	Diese Arbeit
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>pncO</i> ::pJDO3	23F	<i>pncO</i> ::pJDO3 Mutante von 2306	Diese Arbeit
<i>S. pneumoniae</i> 2306Δ <i>pncR-K</i>	23F	<i>pncR-K</i> Deletionsmutante von 2306	Diese Arbeit
<i>Streptococcus salivarius</i> 674			Stammsammlung Universität Kaiserslautern
<i>Streptococcus oralis</i> 510			Stammsammlung Universität Kaiserslautern
<i>Streptococcus pyogenes</i> spy15			Stammsammlung Universität Kaiserslautern
<i>Streptococcus sanguis</i> DSM 20567			Kochanowski <i>et al.</i> , 1993
<i>Streptococcus mitis</i> 10712			Kilian <i>et al.</i> , 1989

### 2.1.2 *E. coli*-Stämme

**Tabelle 3.** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp (Herkunft bzw. Referenz)
<i>Escherichia coli</i> inv $\alpha$ F'	F'endA1 recA1 hsdR17 ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZY A-argF) U169 $\lambda^-$ ; (Invitrogen, Niederlande)
<i>Escherichia coli</i> JM109	recA1, endA1, gyr A96, thi, hsdR17 ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), rel A1, supE44, $\Delta$ (lacproAB), [F, tra D36, proAB, lacIqZ, $\Delta$ M15]; (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

### 2.1.3 Bakterienstämme anderer Gattungen

- *Staphylococcus aureus* 113, Stammsammlung Universität Kaiserslautern
- *Lactococcus lactis* MG1363, Wegmann *et al.*, 2007
- *Micrococcus luteus* DSM2786, Schleifer & Kandler, 1972
- *Enterococcus faecalis* ATCC29212, Swenson *et al.*, 1995
- *Listeria ivanovii*, Hakenbeck & Hof, 1991
- *Listeria welshimeri*, Hakenbeck & Hof, 1991
- *Bacillus subtilis* DB43, Stammsammlung Universität Kaiserslautern
- *Pseudomonas putida* DSM50996, Wunsch *et al.*, 2003

## 2.2 Plasmide und Oligonukleotidprimer

### 2.2.1 Plasmide

**Tabelle 4.** Verwendete Plasmide zur Konstruktion von Mutanten in *S. pneumoniae*.

Vektor	Merkmale	Referenz
pJDC9	<i>ermB</i> , <i>colE1</i>	Chen & Morrison, 1988
pJDR1	<i>ermB</i>	pJDC9-Derivat mit einem internen <i>spiR2</i> -Fragment Reichmann, unveröffentlicht
pJDB2	<i>ermB</i>	pJDC9-Derivat mit einem internen <i>spiB</i> -Fragment Reichmann, unveröffentlicht
pJDO3	<i>ermB</i>	pJDC9-Derivat mit einem internen <i>pncO</i> -Fragment Reichmann, unveröffentlicht
pGEM-T-Easy	<i>bla</i>	Promega, USA
pGEM-AB	<i>bla</i>	pGEM-T-Easy Derivat mit einem Fragment von <i>spiA</i> und <i>pncO</i> Diese Arbeit
pGEM-ASB	<i>bla</i> , <i>aad9</i>	pGEM-T-Easy Derivat mit einem Fragment von <i>spiA</i> , <i>pncO</i> und <i>aad9</i> Diese Arbeit

### **2.2.2 Oligonukleotidprimer**

Die verwendeten Primer wurden anhand der Nukleotidsequenzen von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 entworfen und von der Firma MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert. Die lyophilisiert gelieferten Primer wurden in TE-Puffer gelöst, so dass sich eine Konzentration von 100 pmol/µl ergab. Von dieser Stammlösung wurde eine 1:20 Verdünnung in Wasser hergestellt, was einer Konzentration von 5 pmol/µl entspricht.

**Tabelle 5.** Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer.

Nr.	Primer	Nukleotidsequenz
1	2306-22	GCC AAA TTC ATC CTC GCC AGA A
2	2306-31	TTT GTA GCC CAT CGT CTC AG
3	2306-32	CTG TGT TGT GCC TTG AGT
4	2306-41	GTA CTT CCG TCG CAT CAA TC
5	2306bact-r	TTA TGA TGT AGC GGT ATA GG
6	2306bact-u	GTT TCG CAG GAA GTC TAA TG
7	2306-gap1-for	TTT AGC AAT CGA GGC TAA GG
8	2306-gap1-rev	ACG CTT AAA TCG TGC ATC AG
9	52-17213-u	CCG TCT CTT GCA GTG CCA CCG
10	52-17578-u	GAA CCCF TTG TAC GGC ATA GGC
11	52-27319-u	ATA TTG TTT CGC CTG TCA AAA TGA TAT GTG
12	52-29234-r	GAA GCC AAG ACT AGA ATA TAG GGT GTC
13	628pnc10r	GAA TCT ATT ATA AAA GGG TAA GTA TTG C
14	628pnc11u	CGC TAT GAA GGC TCA GGC GAT TGT C
15	628pnc12r	AGA TGG ACA TGA TTA GAT ACA GAA CC
16	628pnc13u	CGG TGC ATG TGA TCA ATA ATA TTT TCG CAA C
17	628pnc14u	TAT TGA AGG AGG CAA GAA TAA TTG G
18	628pnc15r	AGC ACC ACC ACC TTC TAA GAC ATT AG
19	628pnc1u	GGT GGC GGA TGC AAT TGG GGA GAT TTT G
20	628pnc2r	CTA AAT AAA TTA TCC ATA TAA GG
21	628pnc3r	GCC TAT GTG ATT GCA GTT ATG ATC
22	628pnc3u	GCC TAT GTG ATT GCA GTT ATG ATC
23	628pnc4r	GCA GAG AAT ACA CCT ATA TAA GCG
24	628pnc5u	GTA TCT ATT ATC TAG TAG TCA GG
25	628pnc6r	CCA AAT CTT GAA TTG TCA TCG AAA CAT C
26	628pnc7u	CAC GAA AGC AAC TTA CTC CGT CGG AG
27	628pnc8r	CAT TTG TTC CTC AAA TAG ATG CGA G
28	628pnc9u	CAT GTC CAT CTT TCT ATA TCC GC
29	670pep18700-r	GAA AAA CGT GAT CTT GGC AGG TGG
30	786-787-r	TCA CAT GCG ATA GTT GTG TA
31	786-787-u	ACG AGT CTA GTA ATG GAT GA
32	B-A_fus_u	CAT GAA TAC GGA TCC GAT GGT GCT AGC AGA AGT AGA TAT TCG AAA TCG C
33	bactu23473	TGT TGT CAC AGT TAG AGG TTA TGG
34	Bfus_pncA_u	GGA GTA TTT GTC ATG AAT ACA AAG CTA GCG TAT CTA TTA TCT AGT AGT C
35	blpU-r	CAA AGC CGT CGT CCC ATC CAT GGT CG
36	BlpU-r2	TCG TTA CTA TAA GAC TCC TCT TTA C
37	blpU-u	GAT ACT GTT ATA CTA AAC TTG TC
38	ca2-r-r21811	TCC AAC AAG TCA TGA GCT TCT CCA G
39	ca2-u-21467	CGT TGA TAT CTT CGA TAA TGG CAG AGC
40	CB-19156-r	GAA ATC ACG GCA CCA CCA TCA TCG GCC
41	FragAStart	AGG CTA ACC TTA TCT CCT TGT TTA ATC GTG AG
42	FragAStart2	GAA CGG TTA GGA GAT AAT CTC TGG AG
43	hk17942r	GAC TAG GAT GAG ATG GCG AAC
44	Hk-18401-r	TGT CAC AAA GGA TAG ACA CAA TGG
45	hkAup_2	ACT CTT TTT TAT GGG GGT TAT CAA GAA ATT GGA TAC
46	hpr23233	ATA TCT TAA TTT CGT TAT TCT CCT TGC
47	IS1381dn	ATC CAA AGA AAC AAT CTC CCT TGA C
48	LaF-r-27323	ACC AAC TTG TTT GTA GAC TTT TCA TCC TGC

49	M13-reverse (-49)	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	75	pnc25-u	CGT TGA AGG TGG CGG ATG CAA TTG
50	M13-universal (-21)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	76	pnc26-r	ATA GAG CCT TCT ACT CAA ATA TCC
51	pnc10u	GTA TAG AGG TAT CAC AGC AGG AG	77	pnc-2-bam	TTC <u>AGG</u> <u>ATC</u> <u>CTT</u> ATA AAT AAT ATA
52	pnc11u	GCC TAG AAG ACC TTC TTA TGG CCA C			GGA GTG <u>GCC</u>
53	pnc12u	TCG CAG AAA TAT CGG ACA AGC TGG	78	Pnc2Eco	TTC <u>AGA</u> <u>ATT</u> <u>CTT</u> ATA AAT AAT ATA
54	pnc13u	ATG TTA TCT AGT ATT GAA GGA GGC			GGA GTG <u>GCC</u>
55	pnc14u	GCT AGC TTA ATT TAC AGG GG	79	pnc2u	AAA CGA TGA TAT ACT AAA CTT ATC
56	pnc15u	GGA TAT TTG AGT AGA AGG CTC	80	pnc3r	ATA CCA AAT ACT CTC CCT AAG CGG
57	pnc16u	TCA GCC ATA GAG GAG ATT ATC ATG	81	pnc4u	CTT ACT AGG GAA ATG AGA TTA AGA G
58	pnc17u	ATT GCA AGG AGA ATA ACC GAA ATT	82	pnc5r	AAT CAA TAT CTC CAC CTT CAA CGC
59	pnc18r	AAG TCC AGC TAC TCC TAA AGT GGC C	83	pnc6u	TTG GTC CTT ATA TGG ATG AC
60	pnc19u	CTA CTT ATC TAT TTC TAT TTC GGC	84	pnc7u	GAC ACC ACA GTC TCT CGC ATC
61	pnc1Eco	AGT TTT CC	85	pnc8r	CTA AAT TGC CTC TTC CTC CAC
62	pnc-1-hind	AAA <u>GAA</u> <u>TTC</u> AAA GGA GTA TTT GTC	86	pnc9r	ACT CCC CTG TAA ATT AAG CTA GC
63	pnc1r	ATG	87	pncA_Bfus2_r	GAC TAC TAG ATA ATA GAT ACG <u>CTA</u>
64	pnc20r	AAA <u>AAG</u> <u>CTT</u> AAA GGA GTA TTT GTC			<u>GCT</u> TTG TAT TCA TGA CAA ATA <u>CTC</u> C
65	pnc21r	ATG	88	pncA-specfus1	<u>TCG</u> ATG GAT CCA TAT TGT ATT CAT
66	pnc21u	TAT GAC ATA ATA GAC CTA TCC AC			GAC AAA TAC TCC
67	pnc22r	ACC AAT ATA AGC GAT TAG TTG TTG	89	pncL-bam-up	CAG <u>GGG</u> <u>ATC</u> <u>CAT</u> ATG GCG CAA TTG
68	pnc2306-1u	ATA AG			ATG GGT <u>GTG</u> <u>C</u>
69	pnc2306-2r	ACC AGA ATC CAA ATC ATG ACT CCG C	90	pncNspecfus2	ATT CTA ATT GGT AAT CTT CGA ACT
70	pnc23BamHI_u	CAT TAA CAT AAA AGA GAT ACT CTT			ATT ATC TAG TAG CAG GTT AGC C
71	pnc23EcoRI	AAA TAT AAG	91	pncosd-up	GGG AGG ATT TCT ATG AAA AAG TAT
72	pnc23secfus	AGA TAC GAT AGA GAT TTG TAA AAA			CAA CTT CTA TTC
73	pnc23u	TGT CCC	92	pncP-do	TCG ATG GAT CCA TAT TTC ATA ATT
74	pnc24-r	GCT TGC GTT GAA GGT GGA GAT ATT G			TTT ATA AAT AAT ATA GGA GTG GCC
		CAA GTA CAG CCT GCG GCT AGT TTC C	93	pncPdoNotI	TCG ATC GAG <u>CGG</u> <u>CCG</u> <u>CTC</u> ATA ATT
		GTG <u>GAT</u> <u>CCA</u> GAA GTA GAT ATT CGA	94	pncP-for	TTT ATA AAT <u>AAT</u> <u>ATA</u> <u>GGA</u> GTG GCC
		AAT <u>CGC</u>	95	pncP-rev	TGT CAT TAC AGT TCC TTA TAC G
		GTT <u>GAA</u> <u>TTC</u> CAA GGA AGT AGA TAT	96	pro22363Eco	AAC TGA GGT AGT CAA AAT CA
		TCG <u>AAA</u> <u>TCG</u>			GCA GTC GTC CCT TCT TTA <u>TGA</u> <u>ATT</u>
		ATT CTA ATT GGT AAT CTT CGA ACA	97	proca-r-22820	<u>CTT</u> GC
		AGG AAG TAG ATA TTC GAA ATC GC			GCC TCT TCC TCC ACT AAC TAT TTC
		CAA GGA AGT AGA TAT TCG AAA TCG C	98	proca-u-22363	GAG
		ATT GCA TCC GCC ACC TTC AAC GC	99	procu22363Eco	GCA GTC GTC CCT TCT TTA TTG GTC
					GCA GTC GTC CCT TCT TTA <u>TGA</u> <u>ATT</u>
					<u>CTT</u> GC

100	Prolaf-u-25969	CGG ATT ACG AAT GAA TTT GAG TGC TGG	124	seq-spiBr	ATG GTT TGG CGC TCA ATT AG
101	R6pep18700-r	GTA TCA CAG TAA GTA CCT GAC G	125	seq-spiCr	GAT TCG TTG CTT CTG TCC TC
102	rr13id2r-17109	GGC TCT GGG CGA CGT TTC GAG ATA G	126	seq-spiDr	TGC CTT AGC AAC TCA ATT AC
103	rr13id2u-1676	CTG CTG GCT GAA GTG CAT GAG AAG GGG	127	seq-spiDup	AAT TGA CTG GTG CGG ATT GC
104	rr13up2	CAT GAG AAT ATT TGT TTT AGA GGA TGA TTT TTC C	128	seq-spiH1	GTC AAC CTC ATG TTT CAA TC
105	RT-blpU-for	AAT TAT GGA TAC TGA GAT GCT TG	129	seq-spiR2r	TTC CAC CAT TGG GAA AGA A
106	RT-blpU-rev	CTG CAT AGG CCA CAC C	130	seq-spiR2r	TTC CAC CAT TGG GAA AGA A
107	RT-ldh	ATC GGT TCA GGT ACT TCT C	131	sgtr24884	TGT TGG TAG GAT TCT CCT GCT GTG ATA <u>TGG</u> <u>ATC</u> <u>CAT</u> CGA TTT TCG TTC GTG AAT <u>ACA</u> TG
108	RT-ldh-r	GTG TTC ACC CAT GAT GTA G	132	spc-bam-up	TTC <u>TAA</u> <u>AGC</u> <u>TTG</u> ATT ACC AAT TAG AAT <u>GAA</u> <u>TAT</u> <u>TTC</u> C
109	RT-ldh-rev	GTG AAG GCA AGG GCG TGA CTA AGG	133	spec-hind-do2	CCA AAC ATG TAA GTA CCA ATA AGG TAT CTT GGA GAG AAT ATT GAA TGG AC
110	RT-pncI	GAG TGC TGG TAT TAT CAA TC	134	spec-out-r1	CTC <u>TCA</u> <u>AGC</u> <u>TTA</u> TTG GTC ACT ATT ATC AAT <u>ATA</u> <u>GG</u>
111	RT-pncIr	CCG GAA TTA CCT CCA TAA AC	135	spec-out-u2	TAT CTT TGG TAC CGT CTA TTT TGG AAA ACT TAA CCT TGG
112	RT-pncJ	ATC TTT GGG CAG GAG TAA CA	136	spiA-hind2-do	GTG ATT GGC CAG AAG CGG AA
113	RT-pncJr	GGT TTG AAA AGC GAA GAG AA	137	spicfus2hyb-up	AAT GGT ATC GAT G CA GTT AGA GAC ATA AGA TTA TCT ATA ACC
114	RT-spiH	TTT GGA GCC AGT TCT AAA GG	138	spi-dn	AGG CCA TCA ATA AAT TAC AC
115	RT-spiHr	CTG GTA TTA GGA TGG CTT TC	139	spifus2hyb-do	ACT TGG TCT TGA CTT GGT CAA A
116	seq-pnc2u	GAC GAT TAG TGG TGG AGA TG	140	spiHsequp	TTA TTC CTC CTG ATT CTG TC
117	seq-pnc3r	GTT GAA ATA GGC AGC CTC GA	141	spiUP	GCA GGA AGT CTA ATA GTA AA
118	seq-pnc4u	GCA CCT CCA ATT CCC TGT AAG AAA C	142	spi-up	
119	seq-pnc5r	CCG TCG CAT CAA TCA TTA CCG TGT C	143	thmA-up	
120	seq-pnc6u	AGT GGG TAC TGC CTG CGT GGT TAT C			
121	seq-pnc7r	GCG TTT TCG TCA TAG GTC TGG GGT A			
122	seq-pnc8u	CCC AAA TTC ATG GAA CTC CCG CTC AA			
123	seq-pnc9r	GAG CCA AAA CCT ATG GGG TCT TCT			

Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.



## 2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen

### Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

---

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	

### Luria-Bertani Agar (LB-Agar)

---

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	

### D-Agar

---

α-D(+)-Glucose-Monohydrat	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	15 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
pH-Wert 8,2 (gemessener pH-Wert nach Zugabe aller Komponenten; nicht eingestellt)	

### C-Medium (CpH8)

---

PreC	400 ml
Supplement	13 ml
Glutamin (1 mg/ml)	10 ml
Pyruvat (2 %)	5 ml
Adams III	10 ml
Phosphatpuffer (1 M, pH 8,0)	15 ml
Hefeextrakt	9 ml

### Zusammensetzung der Einzelkomponenten des C-Mediums

#### PreC

---

NaAc	1,2 g
Casaminosäuren (vitaminfrei)	5 g
L-Tryptophan	0,005 g
L-Cystein	0,05 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
pH 7,5 einstellen, autoklavieren	

**3 in 1 Salts**

---

MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	100 g
CaCl <sub>2</sub> wasserfrei	0,5 g
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O (0,1 M)	0,2 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
autoklavieren	

**Supplement**

---

3 in 1 Salts	60 ml
Glucose (20 %)	120 ml
Saccharose (50 %)	6 ml
Adenosin (2 mg/ml)	120 ml
Uridin (2 mg/ml)	120 ml
Alle Komponenten einzeln autoklavieren und steril zusammenpipettieren	

**Adams I**

---

Biotin	0,15 mg
Nicotinsäure	150 mg
Pyridoxin-HCl (B6)	175 mg
Ca-Pantothenat	600 mg
Thiamin-HCl	160 mg
Riboflavin	70 mg
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
sterilfiltrieren, lichtgeschützt lagern	

**Adams II**

---

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	500 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	200 mg
HCl <sub>konz.</sub>	10 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
sterilfiltrieren, lichtgeschützt lagern	

**Adams III**

---

Adams I	160 ml
Adams II	40 ml
Asparagin	2 g
Cholinchlorid	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> [0,1 M]	1, 6 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
sterilfiltrieren, lichtgeschützt lagern	

**Phosphatpuffer (pH 8,0)**

---

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [1 M]	53 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [1 M]	947 ml
autoklavieren	

**DNA-Probenpuffer (6-fach)**

EDTA pH 8,0 [0,2 M]	5 ml
Ficoll 400	1,5 g
Bromphenolblau	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	5 ml

**Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung [0,5 M]**

EDTA	146,13 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
pH-Wert 8,0 mit NaOH <sub>konz.</sub> einstellen	

**Trishydroxymethylaminoethan (Tris)/HCl-Lösung [1 M]**

Trishydroxymethylaminoethan	121 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	
pH-Wert 8,0 mit HCl <sub>konz.</sub> einstellen	

**TE-Puffer pH 8,0**

Tris/HCl pH 8,0 [1 M]	10 ml
EDTA pH 8,0 [0,5 M]	2 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	

**TAE-Puffer (50-fach) pH 8,0**

Tris	242 g
Essigsäure <sub>konz.</sub>	57,1 ml
EDTA pH 8,0 [0,5 M]	100 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	

**Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)**

Phenol	25 ml
Chloroform	24 ml
Isoamylalkohol	1 ml

**X-Gal (5 %)**

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid	100 mg
ad 2 ml N,N'-Dimethyl-Formamid	

**Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid (IPTG)-Lösung [0,5 M]**

Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid	1,2 g
ad 10 ml H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	

## 2.4 Medienzusätze und Antibiotika

**Tabelle 6.** Medienzusätze und Antibiotika mit Konzentrationen und Lösungsmittel.

Antibiotikum/Zusatz	Endkonzentration im Medium		Stammlösung in Lösungsmittel
	<i>E.coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	
Erythromycin (Ery)	500 µg/ml	1 µg/ml	50 mg/ml in Ethanol p.A.
Spectinomycin (Spec)	80 µg/ml	80 µg/ml	80 mg/ml in Wasser
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml	-	100 mg/ml in Wasser
X-Gal	80 µg/ml	-	5 % in N,N'- Dimethyl-Formamid
IPTG	1,2 µg/ml	-	0,12 g/ml in Wasser
BSA	-	0,072 %	8 % in Wasser
Glycin	-	0,5 %	25 % in Wasser

## 2.5 Zentrifugen und Rotoren

**Tabelle 7.** Verwendete Zentrifugen und Rotoren.

Zentrifugen	Rotoren	Hersteller
Kühlzentrifuge RC5B Plus	SLA-1500; SS-34	Sorvall-Dupont
Tischzentrifuge 5415C	3740	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Pr 4/97 #3324	Heraeus Instruments, Hannau
LC Carousel 2.0 centrifuge		Roche Diagnostics, Deutschland

## 2.6 Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung

Zum Animpfen der Bakterien wurde eine Übernachtskultur benutzt: 10 ml C-Medium wurden entweder aus einer Glycerinkultur mit Hilfe eines sterilen Glasstabes, oder mit einer Impföse von einer bewachsenen Agarplatte beimpft und in ein Eiswasserbad gestellt. Der Beginn der Inkubation bei 37°C wurde mittels einer Zeitschaltuhr eingestellt. Dieser Übernachtskultur wurden 100 µl entnommen und in 10 ml frisches C-Medium überimpft.

Zum Wachstum auf Festmedien wurden die Stämme aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur mit einer Impföse auf Agarplatten überimpft und diese bei 37°C inkubiert. Änderungen der Inkubationsbedingungen sind an den entsprechenden Stellen vermerkt.

Die Überwachung des Bakterienwachstums aller verwendeten Bakterien (außer *E. coli*) beruht auf der Messung der Lichtstreuung. Die Messung erfolgte mit einem Nephelometer (Fa. Diffusion Systems, London, England).

Das Wachstum von *E. coli* wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer (Pharmacia LKB Ultraspec III) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Der Lichtweg der Küvette betrug 1 cm, als Leerwert diente unbeimpftes Medium.

## **2.7 Stammkonservierung**

Zur dauerhaften Konservierung der Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 100 µl steriles Glycerin ( $\geq 99,5$  %, p.a., wasserfrei) in ein Cryoröhrchen vorgelegt und 1 ml einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur zugegeben und gründlich gemischt. Diese Mischung wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.8 Mikroskopische Untersuchungen**

Zur optischen Kontrolle der Bakterien wurden Präparate aus Flüssigkulturen oder von Festmedien hergestellt. Es wurden entweder 10 µl Flüssigkultur, oder eine in 10 µl  $\text{H}_2\text{O}$  Millipore resuspendierte Bakterienkolonie auf einem Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas bedeckt und unter Verwendung einer 100-er Ölimmersionsobjektives im Phasenkontrast mikroskopiert (Mikroskop E600, Nikon GmbH, Düsseldorf).

## **2.9 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)**

K. B. Mullis entwickelte 1983 die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR), um beliebige, definierte DNA-Abschnitte innerhalb kürzester Zeit um ein Vielfaches *in vitro* vermehren zu können. Voraussetzung dafür ist, dass man zumindest einen Teil der betreffenden Nucleotidsequenz kennt. Durch den Einsatz bekannter Oligonukleotidprimer mit freiem 3'-OH Ende, die den betreffenden DNA-Bereich auf dem sense- und antisense-Strang der Vorlage (Template) flankieren, ist diese Methode sehr spezifisch. Die Amplifikation geschieht durch zyklische Wiederholung dreier Hauptschritte (1) Denaturierung; (2) Annealing; (3) Elongation. Alle Zyklen zeichnen sich durch eine unterschiedliche Temperatur, sowie durch eine unterschiedliche Dauer aus. Während der Denaturierung bei  $96^{\circ}\text{C}$  trennt sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge auf. An jeden dieser beiden Stränge binden sich während der Annealing-Phase die Primer. Jeder Primer hat eine spezifische Annealingtemperatur. An dem 3'-Ende des Primers wird in der Elongationsphase ein neuer DNA-Strang synthetisiert, der komplementär zu dem Template-

Strang ist. Dies geschieht bei einer Temperatur von ca. 72°C, der optimalen Temperatur der *Taq*-DNA-Polymerase.

### 2.9.1 PCR mit Goldstar Polymerase

Die thermostabile *Taq*-Polymerase wurde aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* isoliert. Die Goldstar Red-Polymerase (Eurogentec, Belgien, Kat Nr. ME0063-05) besitzt eine 5'→ 3' Exonuclease-Replacement-Aktivität. Ihr fehlt jedoch eine 3'→ 5' Exonuclease-Aktivität (proof-reading Aktivität). Des Weiteren fügt sie templateunabhängig an den 3'- Enden A-Überhänge an (Extendase-Aktivität), die Klonierungen (siehe 2.11.7) ermöglicht. Sie wird aus einem *E. coli*-Stamm gewonnen, der eine DNA-Polymerase einer *Thermus aquaticus* Art enthält. Folgender Ansatz wurde in ein 500 µl Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert:

**Tabelle 8.** Pipettierschema für einen PCR-Standardansatz mit Goldstar Red-Polymerase.

Puffer (10-fach)	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
Downstream-Oligonukleotidprimer (5 pmol/µl)	2 µl
Upstream-Oligonukleotidprimer (5 pmol/µl)	2 µl
Template-DNA	1 µl
Goldstar Red-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	76,5 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Folgendes Programm wurde in den Thermocycler der Firma Biometra (UNO 40 Thermoblock, Biometra Göttingen, Deutschland) eingegeben:

**Tabelle 9.** Ablaufprogramm einer PCR in einem UNO 40 Thermoblock, Biometra (Deutschland).

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
1	Denaturierung	96°C	4 min	1
2	Denaturierung	96°C	1 min	
3	Annealing	50 – 65°C <sup>1)</sup>	1 min	30
4	Elongation	72°C	X min <sup>2)</sup>	
5	Delay	72°C	5 min	1
6	Pause	10°C		

<sup>1)</sup> je nach Schmelztemperatur des Oligonukleotidprimers

<sup>2)</sup> pro 1 kb ca. 1 Minute

## 2.9.2 Long Range-PCR

Dieses PCR-Kit ist speziell für 3 kb bis 40 kb große Amplifikate geeignet. Es enthält einen Mix aus Taq- und proofreading DNA-Polymerasen, das heißt die Polymerase besitzt eine 3'→ 5' Exonuclease-Aktivität, um ein falsch gepaartes Nukleotid vom 3'- Ende des synthetisierten Stranges zu entfernen. Die Ansätze und Temperaturprofile entsprechen den Herstellerangaben.

**Tabelle 10.** Pipettierschema für eine Long Range-PCR mit dem Expand Long Template PCR System, Roche.

dNTP-Mix (10 mM)	1,5 µl
Downstream-Oligonukleotidprimer (5 pMol/µl)	1,5 µl
Upstream-Oligonukleotidprimer (5 pMol/µl)	1,5 µl
Template-DNA	1 µl
Puffer 1 (10-fach)	5 µl
Polymerase-Mix	0,75 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	38,75 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Für den Thermocycler (Biometra UNO 40 Thermoblock, Biometra Göttingen, Deutschland) wurde folgendes Programm erstellt:

**Tabelle 11.** Temperaturprofil für eine Long Range-PCR in einem UNO 40 Thermoblock, Biometra (Deutschland).

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
1	Denaturierung	95°C	4 min	1
2	Denaturierung	95°C	15 sec	10
3	Annealing	50 – 65°C <sup>1)</sup>	30 sec	
4	Elongation	68°C	X min <sup>2)</sup>	
5	Denaturierung	95°C	10 sec	20
6	Annealing	50 – 65°C <sup>1)</sup>	30 sec	
7	Elongation	68°C	X min <sup>2)</sup> + 20 sec/Zyklus	
8	Delay	68°C	7 min	1
9	Pause	10°C		

<sup>1)</sup> je nach Schmelztemperatur des Oligonukleotidprimers

<sup>2)</sup> pro 1 kb ca. 1 Minute

Zur Amplifikation der *pnc*-Cluster der verschiedenen *S. pneumoniae*-Stämmen wurden die Primer proca-u-22363 (stromabwärts des zu amplifizierenden *pnc*-Clusters in Gen *spiA*) und pncP-do (stromaufwärts, am Ende des *pnc*-Clusters) benutzt. Die Annealing-Temperatur lag bei 55°C, die Elongations-Zeit bei 6 Minuten. Nach 10 Zyklen verlängerte sich die Elongations-Zeit um 20 sec pro Zyklus.

### 2.9.3 Real-Time PCR

Zur Quantifizierung einer Transkription sind vier Methoden üblich: Northern Blotting, *in situ* Hybridisierung (Parker & Barnes, 1999), RNase Protection Assays (Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992) und die Reverse Transcription PCR (Weis *et al.*, 1992). Eine fünfte Methode, cDNA Arrays, ist immer noch ein hoher Kostenfaktor (Bucher, 1999). Die Real-Time PCR zählt zu den empfindlichsten Methoden zur Detektion von mRNA. Da RNA nicht als Template für eine PCR dienen kann, besteht der erste Schritt der RT-PCR in einer reversen Transkription der RNA in cDNA. Dieses erfordert für gewöhnlich bestimmte RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerasen, entweder in verschiedenen („two-enzyme/two-tube“) oder einem („two-enzyme/one-tube“) Reaktionsansatz.

Bei der RT-PCR wird die Amplifikation mit der quantitativen Detektion unmittelbar kombiniert. Dies geschieht mit einem Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green), der sich in doppelsträngiger DNA einlagert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Im LightCycler wird diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus (Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen (abhängig von der Zahl der Ausgangskopien) wird die Fluoreszenz schließlich messbar. Der LightCycler besteht aus einer zylindrischen Kammer, die mit Luft geheizt wird. Als Reaktionsgefäße werden dünne Glaskapillaren mit einem Volumen von 20 µl verwendet. Die Detektionseinheit besteht aus einer blauen LED und ist auf dem Boden der Reaktionskammer angebracht. Die Proben werden nacheinander über die Detektionseinheit gefahren und gemessen. Im LightCycler werden die Fluorophore mit einer Blaulicht emittierenden Diode (470 nm) beleuchtet. Gelbgrüne Fluorophore wie SYBR Green werden dadurch spezifisch angeregt und die resultierende Emissionsfluoreszenz wird dann gemessen.

Da sich SYBR Green auch an unspezifische Amplifikationsprodukte anlagert, wurden Schmelzkurven erstellt und die Schmelzpunkte der Produkte bestimmt. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur bei der die Hälfte der komplementären Sequenzen hybridisiert vorliegt. Er kann vorher theoretisch für jedes Amplifikationsprodukt errechnet werden und soll mit der bestimmten Schmelzpunkttemperatur übereinstimmen. Unspezifische Amplifikationsprodukte oder Primerdimere können aufgrund abweichender oder gar mehrerer Schmelzpunkte identifiziert werden.



#### 2.9.4 RNA-Isolierung aus *S. pneumoniae*

Von den zu testenden Stämmen wurden je drei Ansätze in 10 ml C-Medium angezogen. Das Wachstum wurde nephelometrisch kontrolliert und bei N=30, N=60 und N=90 wurde die komplette Kultur zentrifugiert (4°C; 10 min; 14000 x g; Kühlzentrifuge RC5B Plus; SLA-1500; Sorvall-Dupont), der Überstand verworfen, die Zellen mit 100 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Durch Zugabe von 100 µl 0,01 % Natrium-Deoxycholat/0,02 % SDS und anschließendem Invertieren wurden die Zellen lysiert und die RNA mittels des Qiagen RNeasy-Kit nach Herstellerangaben isoliert. Zur Aufbewahrung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### 2.9.5 Reverse Transkription von cDNA / Durchführung der RT-PCR

Zwei gebräuchliche Reverse Transkriptasen (RT) sind die *Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase* (AMV-RT) und die *Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase* (MMLV-RT). Die AMV-RT ist die stabilere Polymerase. Sie behält ihre Aktivität bis zu 55°C bei und hat die Fähigkeit durch eine intrinsische RNase H Aktivität problematische sekundäre RNA Strukturen zu beseitigen. Im Gegensatz dazu besitzt die MMLV-RT eine herabgesetzte RNase H Aktivität, welche die Synthese langer Amplikons begünstigt. Die RT kann mit spezifischen Primern, Random Hexamer-Primern oder Oligo-dT Primern durchgeführt werden. Die Verwendung von mRNA-spezifischen Primern reduziert die Anzahl nicht gewünschter Nebenprodukte, wohingegen Random-Hexamer-Primer oder oligo-dT Primer die Gesamtzahl an mRNA Molekülen steigert, wodurch auch kleine Mengen an RNA untersucht werden können.

Die für die RT-PCR benötigte RNA wurde anhand der bereits beschriebenen Vorgehensweise isoliert (siehe 2.9.4), die Konzentration photometrisch bestimmt und 1 µg RNA mit Hilfe des First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) mit Random Hexamer-Primern umgeschrieben. Dabei wurde anhand der Herstellervorgaben vorgegangen. Die cDNA wurde 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>PCR Grade</sub> verdünnt. Die RT-PCR wurde anhand der Vorgaben des LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt. Es wurden die LightCycler Kapillaren mit einem Volumen von 20 µl benutzt.

Folgende Primer wurden mit Hilfe der LightCycler® Probe Design Software 2.0 entworfen: RT-lhd /RT-ldh-rev (*ldh*), RT-pncI-for/RT-pncI-rev (*pncI*), RT-pncJ-for/RT-pncJ-rev (*pncJ*) und RT-pncE-for/RT-pncE-rev (*pncE*). Die zugehörigen Nukleotidsequenzen sind einer

Tabelle (siehe Tabelle 5) angeben. Die Konzentration der Primer betrug 10 pMol. Ein RT-PCR Ansatz bestand aus:

**Tabelle 12.** Pipittierschema eines RT-PCR Ansatzes mit dem LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics).

cDNA (1:10)	5 µl
Downstream-Oligonukleotidprimer (10 pMol/µl)	1 µl
Upstream-Oligonukleotidprimer (10 pMol/µl)	1 µl
Master Mix	4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>PCR Grade</sub>	9 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Alle RT-PCR Ansätze wurden mit dem LC Carousel 2.0 für 15 Sekunden bei 735 x g zentrifugiert, um den Ansatz in der Kapillare zu verteilen.

Die eigentliche RT-PCR wurde in einem LightCycler 2.0 Thermocycler mit folgendem Ablaufsprogramm durchgeführt.

**Tabelle 13.** Temperaturprofil einer RT-PCR in einem LightCycler 2.0, Roche Diagnostics

#### 1. Aktivierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Anstieg	Messmethode	Zyklen
1	95°C	10 min	20°C/sec	-	1

#### 2. Amplifikation (Quantifikation)

Schritt	Temperatur	Dauer	Anstieg	Messmethode	Zyklen
1	95°C	10 sec	20°C/sec	-	45
2	53°C	10 sec	20°C/sec	-	
3	72°C	14 sec	20°C/sec	Punktuell	

#### 3. Schmelzkurve

Schritt	Temperatur	Dauer	Anstieg	Messmethode	Zyklen
1	95°C	0 sec	20°C/sec	-	1
2	65°C	15 sec	20°C/sec	-	
3	95°C	0 sec	0,1°C/sec	kontinuierlich	

#### 4. Abkühlen

Schritt	Temperatur	Dauer	Anstieg	Messmethode	Zyklen
1	45°C	30 sec	20°C/sec	-	

Dabei unterscheidet man die folgenden Schritte: (1) Aktivierung: Bei Raumtemperatur ist die Polymerase durch Blockierung des aktiven Zentrums inaktiviert. Während der Aktivierung werden die blockierenden Substanzen durch unspezifische Primerbindungen entfernt. Gleichzeitig wird die DNA denaturiert. Während der Amplifikation (2) werden die zu untersuchenden Gene amplifiziert. Die Fluoreszenz wird nur punktuell während der

Elongationsphase gemessen. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte an. Um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen wird eine Schmelzkurve (3) erstellt. Während dieser Phase wird die Temperatur schrittweise langsam erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Erreicht die Temperatur die Schmelztemperatur des Amplifikationsproduktes bricht die Fluoreszenz ein, welches sich bei grafischer Darstellung als Peak darstellt. Als letzter Schritt wird der RT-PCR Ansatz auf 45°C abgekühlt (4).

## **2.10 DNA-Techniken**

### **2.10.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae***

Für die Präparation wurden 10 ml einer Kultur von *S. pneumoniae* bei einem Nephelo-Wert von 70 bis 80, also zu Beginn der stationären Phase, abzentrifugiert (4°C, 9700 x g, 10 min; RC5B Plus, Sorval-Dupont; Rotor: SLA-1500). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 9700 x g, 2 min; RC5B Plus, Sorval-Dupont; Rotor: SLA-1500) wurden das Pellet in 180 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) und 200 µl SDS (2 %) wurde durch Invertieren des Tubes gemischt und anschließend 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Weitere 10 Minuten Inkubationszeit bei 37°C folgten nach Zugabe und sofortigem Mischen von 100 µl Proteinase K (20 mg/ml). Anschließend wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt und nach dem Trocknen in einer SpeedVac in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.10.4) und sie wurde bei 4°C gelagert.

### **2.10.2 Glykogen/Ethanol-Präzipitation**

Die Präzipitation mit Alkohol ist eine einfache Möglichkeit zur Konzentrierung oder Reinigung von DNA. Dabei ist die Fällung der DNA aus einer wässrigen Lösung mit Ethanol üblich. In Anwesenheit von Alkohol und Glykogen bildet die DNA bei niedrigen Temperaturen ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation pelletieren lässt. Ein Nebeneffekt der Methode ist, dass viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, so dass ein gewisser Reinigungseffekt erzielt wird.

Dabei wird die DNA enthaltende Lösung mit 1 µl Glykogen (35 mg/ml) gemischt und 3 Volumen Ethanol (100 %, -20°C) zugeben. Die Präzipitation erfolgte über zwei Stunden bei

-80°C. Nach einer Zentrifugation (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) wurde der Überstand entfernt und das verbliebene Pellet mit Ethanol (70 %, -20°C) gewaschen. Nach dem Abgießen der Waschlösung wurde die DNA in einer SpeedVac getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst.

### **2.10.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion**

Der Probe wurde ein gleiches Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mix (25:24:1) zugegeben, durch Schütteln auf einem Eppendorf-Schüttler für 30 Minuten gemischt und anschließend 5 Minuten zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Die wässrige (obere) Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die ersten Schritte wiederholt, die wässrige Phase abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Oberphase wurde mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Dabei fällt die DNA aus. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei RT stehen gelassen und dabei mehrfach invertiert. Anschließend wurde für 10 Minuten zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) und den Überstand abgossen. Das Pellet wurde in 200 µl Ethanol (100 %) aufgenommen, und 5 Minuten zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Dieser Waschschrift wurde wiederholt und das Pellet in einer SpeedVac getrocknet, zur Weiterverarbeitung in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und 1 Stunde bei 37°C stehen gelassen.

### **2.10.4 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit einer DNA-Probe erfolgte photometrisch mit Hilfe des GeneQuant Photometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Dabei wurde die Absorption der betreffenden Lösung bei 260 und 280 nm in einer Quartzküvette gemessen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäureprobe. Dieser Wert, auch Ratio bezeichnet, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Ein niedriger Wert kann eine Verunreinigung mit Proteinen anzeigen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte an diesem Photometer automatisch unter Verwendung folgender Werte, welche für eine Quartzküvette mit einem Lichtweg von 5 mm und einer Füllmenge von 10 µl gelten:

1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg/ml dsDNA

1 OD<sub>260</sub> entspricht 33 µg/ml ssDNA

Die Konzentration sollte zwischen 10 und 200 ng/µl liegen. Bei höherer Konzentration wurde die Probe verdünnt bzw. bei niedrigerer Konzentration mittels einer Glykogen/Ethanol-Präzipitation erhöht.

### 2.10.5 Verdau durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen ermöglichen es, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Die Restriktionsspaltung erzeugt Fragmente, die nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel anhand des Bandenmusters Rückschlüsse auf die Sequenz der untersuchten DNA zulassen. So lässt sich z.B. schnell und einfach überprüfen, ob ein Plasmid ein bestimmtes DNA-Fragment enthält oder nicht. Die analytische Restriktionsspaltung kann somit einen ersten Aufschluss geben, ob eine Klonierung erfolgreich war. Diese analytische Kontrolle erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

Die präparative Restriktionsspaltung dient dazu, zwei DNA-Fragmente mit definierten Endonukleasen so zu spalten, dass nach einer Aufreinigung eine Ligation der beiden geschnittenen Fragmente möglich ist.

**Tabelle 14.** Pipettierschema für einen analytischen und präparativen Restriktionsverdau.

	<b>analytischer Ansatz</b>	<b>präparativer Ansatz</b>
Plasmid-DNA	10 µl	45 µl
Puffer (10-fach)	2 µl	10 µl
Enzym	2 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	6 µl	40 µl
	<hr/> 20 µl	<hr/> 100 µl

Um eine optimale Reaktionsbedingung zu gewährleisten, wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und Inkubationstemperaturen verwendet.

Nach erfolgtem Restriktionsverdau von ca. 1 bis 2,5 Stunden, wurde der gesamte Ansatz vor dem weiteren Bearbeiten mit Glykogen/Ethanol präzipitiert (siehe 2.10.2).

### 2.10.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase

Die Grundlage der molekularen Klonierungstechnik liegt darin, Plasmid-DNA mit Insert-DNA unter Zusatz einer Polynukleotid-Ligase kovalent zu einem zirkularen Molekül zu

ligieren. Die Ligation der linearisierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase. Die Ligase verbindet lineare doppelsträngige DNA-Fragmente durch Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 3'-OH Ende und dem 5'-Phosphat Ende beider Stränge. Die für die Reaktion benötigte Energie wird durch Hydrolyse des im Ligationspuffer enthaltenen ATPs gewonnen.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA-Ligase (Invitrogen) verwendet. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 10 µl. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C in einem Kühlraum inkubiert.

**Tabelle 15.** Pipettierschema für die Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase, Invitrogen.

Vektor-DNA	1 µl
Insert-DNA	3 µl
Puffer (5-fach)	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl

### 2.11.7 Vektorligation

Eine schnelle und einfache Methode zur Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmide macht sich den Umstand zunutze, dass die Taq-Polymerase immer einen Adenin-Überhang am 3'-Ende des synthetisierten DNA-Stranges anfügt. Geeignete Plasmide besitzen auf der entgegengesetzten Seite an ihrem 3'-Ende einen Thymin-Überhang. Damit kann das zu ligierende DNA-Fragment eine Basenpaarung mit dem linearisierten Plasmid eingehen, wodurch das Plasmid in eine zirkuläre Form übergeht. Die Orientierung des DNA-Fragmentes innerhalb des Plasmides ist nicht gerichtet, sondern zufällig. Zur Klonierung wurde das pGEM-T-Easy-Vektor-Kit von Promega (USA) verwendet und anhand der Herstellerangaben verfahren.

### 2.10.8 Elektrophorese und Nachweis von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf der Wanderung der negativ geladenen DNA-Moleküle bei der Anlegung einer Gleichspannung. Die Auftrennung der Fragmente ist dadurch von der Größe (Molekulargewicht) und der Konformation der DNA-Moleküle abhängig. Darüber hinaus wird die Laufgeschwindigkeit vom Agarosegehalt des Gels beeinflusst. Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wird das Gel

mit Ethidiumbromid angefärbt, welches in die DNA-Helices interkaliert und im UV-Durchlicht eines Transilluminators fluoresziert (LePecq & Paoletti, 1967). Es ist hierbei zu beachten, dass kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben. Die Zuordnung der DNA-Banden erfolgt über einen Vergleich mit einem externen Längenstandard (kb-ladder).

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten dienten Agarosegele aus 50 ml Agaroselösung verschiedener Konzentrationen (0,8 % bis 1,2 %), die in einen Gelträger mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen wurde. Aus dem erstarrten Agarosegel wurde der Kamm entfernt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 5:1 mit DNA-Probenpuffer gemischt, wobei das enthaltene Bromphenolblau als optischer Marker diente. Das Glycerin erhöht hierbei die Dichte, so dass die Proben in die angelegten Taschen im Agarosegel absinken. Das Anfärben der DNA erfolgte mit einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) und die DNA-Fragmente konnten anschließend unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) visualisiert, mit einem Videodokumentationssystem („digit-Store duo“, Fa. INTAS, Göttingen) und einem Mitsubishi Video Copy Prozessor K65HM fotografiert werden. Falls eine Aufreinigung aus dem Gel erfolgte, wurde das entsprechende DNA-Fragment ebenfalls unter UV-Licht (Wellenlänge 550 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Kit aufgereinigt.

### **2.10.9 DNA-Plasmidpräparation aus *E. coli***

#### **Alkalische Lyse**

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode zur Plasmidpräparation aus *E. coli* beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979).

5 ml einer *E. coli*-Kultur wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (1 Minute, RT, 16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer resuspendiert und anschließend mit 150 µl 0,2 N NaOH/1 % SDS lysiert und 30 Sekunden bei RT inkubiert. Mischen nach Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,5). Nach der Zugabe von 2 Tropfen Chloroform wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments), der Überstand mit 1 ml EtOH vermischt um 30 Minuten bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einer SpeedVac getrocknet und in 50 µl TE-Puffer und 2 µl RNase (10 mg/ml) aufgenommen und 30 Minuten bei RT inkubiert.

## **Qiagen-Kit**

Zur Aufreinigung von Plasmiden aus einer Agarosegelelektrophorese, oder zur anschließenden Sequenzierung wurde das Plasmid Purification Kit der Firma Qiagen benutzt. Die Durchführung erfolgte anhand der Vorschrift des Herstellers.

### **2.10.10 Herstellung von Zell-Lysaten**

#### **Zell-Lysat von *E. coli***

Eine Impföse Bakterien wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> resuspendiert, anschließend 5 Minuten bei 96°C aufgeköcht und 2 Minuten bei RT zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Davon wurde 1 µl als Template-DNA in die PCR eingesetzt.

#### **Zell-Lysat von *S. pneumoniae***

##### **Aus Glycerinkultur:**

200 µl einer Glycerinkultur wurden bei RT für 2 Minuten zentrifugiert (16000 x g, Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) und der Überstand verworfen. 30 µl Triton-X 100 (10 %) wurden zugegeben und sofort 1 Minute bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 96°C aufgeköcht und wieder 10 Minuten bei 16000 x g und RT (Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde als Template-DNA in die PCR eingesetzt.

##### **Aus Einzelkolonie:**

Eine Impföse Bakterien wurde in 60 µl Triton-X 100 (10 %) resuspendiert und 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 96°C aufgeköcht und bei 16000 x g und RT 10 Minuten (Biofuge pico Pr 4/97 #3324, Heraeus Instruments) zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde als Template-DNA in die PCR eingesetzt.

### **2.10.11 Aufreinigung amplifizierter oder ligierter DNA-Fragmente**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder ligierten DNA-Fragmenten wurde das JETQUICK Plasmid/PCR/Gel Extraction Kit der Firma Genomed (Deutschland) verwendet. Die einzelnen Schritte wurden nach den Angaben im Herstellerprotokoll durchgeführt und die DNA in 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> aufgenommen.



## **2.11 Klonierungstechniken**

### **2.11.1 Elektroporation von *E. coli***

#### **Präparation von *E. coli*-Zellen für die Elektroporation**

1000 ml vorgewärmtes LB-Medium (37°C) wurden mit einer 5 ml Übernachtskultur (siehe oben) angeimpft und bei 37°C unter starkem Schütteln (280 rpm) inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurde die Kultur schnell im Eiswasser abgekühlt und anschließend für 1 Minute bei 4°C und 9700 x g (Kühlzentrifuge RC5B Plus; SLA-1500; Sorvall-Dupont) abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 1000 ml kaltem Glycerin (10 %) resuspendiert, für 1 Minute bei 4°C und 8000 x g (Kühlzentrifuge RC5B Plus; SS-34; Sorvall-Dupont) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Waschschrte wurden mit 500 ml und 20 ml Glycerin (10 %) wiederholt, was zu einer Reinigung und Konzentrierung der Zellen führt. Zuletzt wurde in 3 ml Glycerin (1 %) resuspendiert und Portionen zu 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **Elektroporation von *E. coli***

Alle Plasmide wurden mit Hilfe der Elektroporation in *E. coli* transformiert. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

5 ml LB-Medium wurden auf 37°C vorgewärmt. 100 µl elektro-kompetente Zellen wurden mit DNA-Lösung [100 ng/µl] gemischt und in eine sterile eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,2 cm) gefüllt. Die Elektroporation mit dem Genpulser (Biorad) wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Kapazität	25 µF
Widerstand	200 Ω
Spannung	2100 V

Die Pulsdauer sollte zwischen 4,5 und 4,7 ms liegen. Direkt nach der Elektroporation erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium (37°C) in die Küvette. Die Zellsuspension wurde möglichst vollständig entnommen und in ein Reagenzglas überführt. Zur Erholung der Zellen (phänotypische Expression) wurden diese 1 Stunde im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Blau/Weiß-Selektion (siehe 2.11.2) konnten die Klone isoliert werden, die das Vektorkonstrukt aufgenommen hatten.

### 2.11.2 Blau/Weiß-Selektion

Die Multiple-Cloning-Site (MCS) liegt bei vielen Plasmiden in einem Teil des *lacZ*-Gens, welcher für die N-terminalen 141 Aminosäuren der  $\beta$ -Galaktosidase codiert ( $\alpha$ -Fragment). Der zu transformierende *E. coli*-Stamm trägt auf dem Chromosom die so genannte M15-Deletion innerhalb des *lac*-Operons. Dadurch werden die Aminosäuren 11 bis 14 der  $\beta$ -Galaktosidase nicht codiert und nur der C-Terminus des Enzyms liegt vor ( $\beta$ -Fragment). Wird kein DNA-Fragment in das Plasmid eingefügt, so bildet sich aus dem  $\alpha$ -Fragment des Plasmids und dem  $\beta$ -Fragment des *E. coli*-Stammes eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase ( $\alpha$ -Komplementation) (Langley *et al.*, 1975; Marinkovic *et al.*, 1975). Das Enzym setzt bei Induktion mit IPTG im Medium befindliches X-GAL um. X-GAL ist ein chromogenes Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase, welches durch Hydrolyse einen blauen Farbstoff bildet. Dadurch erscheinen Bakterien bzw. Kolonien, die ein intaktes *lacZ'*-Gen besaßen blau. Wird jedoch das *lacZ'*-Gen durch ein eingefügtes DNA-Fragment unterbrochen, wird die Galaktosidase-Domäne als Fusionsprotein mit der klonierten Proteinsequenz exprimiert. Dies stört in der Regel die Komplementation so stark, dass keine funktionelle Galaktosidase gebildet wird und die Kolonie weiß bleibt. So lassen sich farblich die Bakterien, die ein Plasmid mit integriertem DNA-Fragment aufgenommen haben, selektieren.

### 2.11.3 Transformation

#### Transformation von *S. pneumoniae*

Die Transformation von *S. pneumoniae* wurde anhand des Protokolls von Lacks und Hotchkiss von 1960 (Lacks & Hotchkiss, 1960; Ottolenghi & Hotchkiss, 1962) durchgeführt. Zur Präparation natürlich kompetenter Zellen wurde *S. pneumoniae* 1:100 aus einer frischen Übernachtskultur in C-Medium mit Zusatz von BSA No. 5 (Fa. Sigma) angeimpft und bei 37°C inkubiert. Bei einem Nephelo-Wert von ca. 35 wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben, gründlich gemischt, und die Kultur in Aliquots zu 200  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 20  $\mu$ l einer auf Eis aufgetauten Glycerinkultur kompetenter Zellen mit 180  $\mu$ l C-Medium verdünnt. Nach Zugabe von 1 – 5  $\mu$ l DNA-Lösung wurden die Zellen 30 bis 60 Minuten bei 30°C und anschließend 1 bis 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Je 100  $\mu$ l des Transformationsansatzes und entsprechende Verdünnungen wurden in eine Petrischale pipettiert und danach mit flüssigem, auf 48°C abgekühltem D-Agar gemischt,

der das zur Selektion benötigte Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration enthielt. Die Inkubation der D-Agarplatten erfolgte bei 37°C.

Zur Transformation schlecht transformierbarer klinischer Isolate wurden die Zellen wie oben beschrieben präpariert, wobei dem Inkubationsmedium zusätzlich noch Glycin (Endkonzentration 0,5 %) (Bricker & Camilli, 1999; Pozzi *et al.*, 1996) zugegeben wurde. Des Weiteren wurde dem Transformationsansatz zur Steigerung der Kompetenz das stammspezifische synthetische CSP (siehe 1.3) (Alloing *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1996) zugesetzt (Endkonzentration 100 ng/ml).

### **Bestimmung der Transformationseffizienz**

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde eine Kultur wie beschrieben angezüchtet, wobei der wachsenden Kultur ab Nephelo-Wert 10 bis zum Erreichen der stationären Phase (N=120) alle 30 Minuten Aliquots entnommen und nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 10 %) schockgefroren wurden. Diese Proben wurden anschließend parallel transformiert. Als Standard diente chromosomale DNA aus dem Stamm *S. pneumoniae* amiA9 (Trombe *et al.*, 1984).

Um eine Verfälschung der Effizienzbestimmung durch sich während der phänotypischen Expressionsphase teilende Zellen zu vermeiden, wurde die Überschichtungstechnik angewandt: die Transformationsansätze wurden in geeigneten Verdünnungen direkt in 10 ml D-Agar ohne Antibiotikum eingegossen. Die phänotypische Expression erfolgte dann 2 Stunden bei 37°C im Festmedium. Anschließend wurde ein Teil der Platten zur Bestimmung der Transformantenzahl mit 10 ml D-Agar (ohne Blut, mit doppelt-konzentrierten Antibiotikum) überschichtet, während höhere Verdünnungen ( $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$ ) des Transformationsansatzes zur Bestimmung der Lebendkeimzahl mit 10 ml D-Agar (ohne Blut, ohne Antibiotikum) überschichtet wurden. Die Transformationseffizienz ergab sich nach Auszählen geeigneter Verdünnungen als prozentualer Wert aus

$$E = (N_T / N_L) \cdot 100[\%],$$

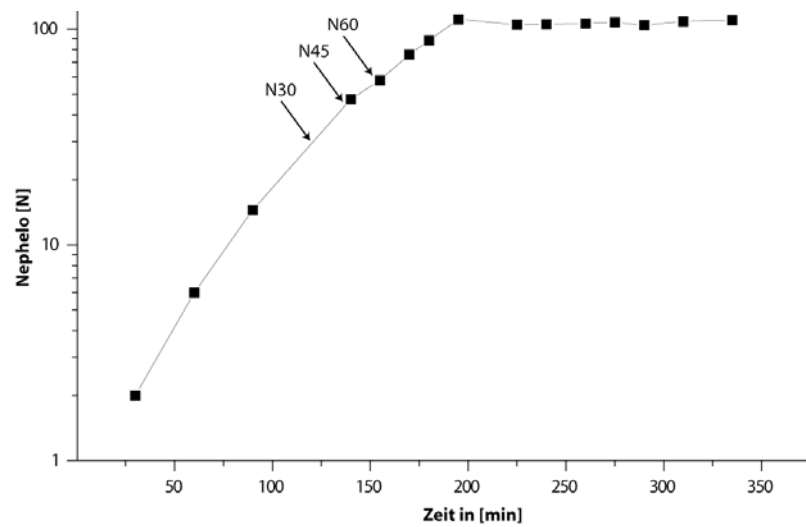
wobei E = Transformationseffizienz,  $N_T$  = Zahl der Transformanten bezogen auf 1 ml Kultur und  $N_L$  = Lebendkeimzahl in 1 ml Kultur darstellt.

Für die Transformation von *S. pneumoniae* 2306 wurde ein für diesen Stamm angepasstes Transformationsprotokoll verwendet. Dazu wurden kompetente Zellen in C-Medium mit Zusatz von 45 µl BSA-Lösung (16 %) angezogen. Die Tab. 16 listet die Nephelo-Werte und

die dazugehörigen Zeiten auf, die Abb. 7 zeigt den Wachstumsverlauf von *S. pneumoniae* 2306. Zu den Minuten 125 (N=32,1), 140 (N=47,2) und 155 (N=58,0) wurden 200 µl Kultur entnommen, mit 20 µl Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

**Tabelle 16.** Wachstumsmessung *S. pneumoniae* 2306 bei der Herstellung kompetenter Zellen.

Zeit [min]	Nephelo [N]
0	-0,3
30	2,0
60	6,0
90	14,5
125	32,1
140	47,2
155	58,0
170	76,0
180	88,5
195	110,8
225	104,7
240	105,0
260	106,1
275	107,2
290	104,1
310	108,4
335	109,6



**Abbildung 7.** Wachstumskurve *S. pneumoniae* 2306 bei der Herstellung kompetenter Zellen. Die Pfeile zeigen die Punkte der Probenentnahme.

Für die Transformation wurde folgender Ansatz pipettiert:

200 µl	kompetente Zellen <i>S. pneumoniae</i> 2306
10 µl	Plasmide (pJDR1; pJDB2; pJDO3; pGEM-ASB-1)
210 µl	

Der Transformationsansatz wurde für 30 Minuten bei 30°C, anschließend für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach wurden 150 µl auf Blutagarplatten mit Selektionsmarker (Erythromycin [1 µg/ml] oder Spectinomycin [80 µl/ml]) ausplattiert. Von den restlichen 50 µl wurde eine Verdünnungsreihe ( $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ ) angefertigt und davon jeweils 50 µl auf eine Blutagarplatte ohne Antibiotikum ausplattiert. Es wurde jeweils zwei Ansätze durchgeführt.

Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C wurden die Transformanten gepickt und in 1 ml C-Medium mit passenden Antibiotika (Erythromycin [1µg/ml] oder Spectinomycin [80 µl/ml]) angezogen und Glycerinkulturen (siehe 2.7) hergestellt. Zur Überprüfung der Transformanten

wurden Zell-Lysate (siehe 2.10.10) hergestellt und 1 µl davon als Template in die PCR eingesetzt. Folgende Primer (außer pGEM-ASB-1) wurden jeweils in Kombination mit den Primern M13-universal (-21)/M13-reverse (-49), welche in der Multiple Cloning Site (MCS) von pJDC9 primen, verwendet:

<b>Transformanten mit Plasmid</b>	<b>Primer 1</b>	<b>Primer 2</b>
pJDR1	rr13id2u-1676	rr13id2r-17109
pJDB2	ca2-u-21467	ca2-r-21811
pJDO3	pncosd-up	52-29234r
pGEM-ASB-1	FragAStart	specoutr1

Zusätzlich wurden die Transformanten auf Blutagarplatten mit Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.12 Sequenzierung

### 2.12.1 Grundlage und Durchführung der Sequenzierungsreaktionen

Die Sequenzierung der DNA erfolgt nach der von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelten enzymatischen Ketten-Abbruch-Methode, die auch als „Didesoxy-Sequenzierung“ bezeichnet wird. Die Methode beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Matrizenstrangs. Hierbei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Amplifikation mittels spezifischer Terminatoren (2', 3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat; ddNTPs) erzeugt, die zusätzlich zu den 2'-Desoxynucleotiden im Reaktionsansatz sind. Aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe der ddNTPs bricht die Kettenverlängerung eines entstehenden DNA-Fragments nach dem statistischen Einbau dieses Terminators ab, da die Ausbildung einer Phosphodiester-Bindung zu einem weiteren Nukleotid nicht mehr möglich ist. Bei der ursprünglich entwickelten Sanger-Methode wurden vier separate Reaktionen, jede mit einem anderen, radioaktiv markierten ddNTPs als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Hierbei lassen sich DNA-Moleküle trennen, die sich in der Länge nur um ein Nukleotid unterscheiden. Aus der Abfolge der Banden im Autoradiogramm lässt sich direkt die DNA-Sequenz ablesen.

Als Variante der Sanger-Methode werden an Stelle von radioaktiv markierten ddNTPs Terminatoren mit Fluoreszenzmarkern eingesetzt (Ansorge *et al.*, 1986; Ansorge *et al.*, 1987; Freeman *et al.*, 1990) wobei jedes der vier Didesoxy-Nukleotide mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden ist. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt

darin, die so markierten DNA-Fragmente zusammen in einer Spur des Polyacrylamidgels auftragen zu können (Prober *et al.*, 1987). Die Detektion bei dieser Vierfarbentechnik erfolgt durch zwei Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm. Das senkrecht hierzu emittierte Fluoreszenzlicht wird von Photodioden hinter dem Gel gemessen und die Datenauswertung erfolgt durch ein angeschlossenes EDV-System.

Eine weitere Steigerung der Effizienz und des Durchsatzes lässt sich durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen erreichen. Diese Methode erfolgt analog zur PCR. Bei der enzymatischen Sequenzierung wird eine DNA-Replikation bis zum statistischen Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs, mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt. Aufgrund der wiederholten Synthese neuer DNA-Fragmente sind nur geringe Mengen an Template-DNA erforderlich. Darüber hinaus lassen sich durch die Verwendung jeweils nur eines Primers die beiden komplementären Sequenzen einer doppelsträngigen DNA separat analysieren.

Eine weitere Verbesserung dieser Cycle-Sequencing-Methode lässt sich auch durch spezielle DNA-Polymerasen erreichen. Applied Biosystems (Deutschland) bietet hierfür die sogenannte AmpliTaq-Polymerase FS an. Es handelt sich hierbei um eine Doppelmutante der bekannten *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, deren 5'-3'-Nuclease-Aktivität (Mutation G46D) verringert und die Akzeptanz gegen Didesoxynukleotide (Mutation F667Y) erhöht wurde.

Von den zu sequenzierenden Stämmen wurde genomische DNA isoliert, die als Template in eine Long-Range PCR eingesetzt wurde. Als Primer wurden für das *pnc*-Cluster *proca-u-22363/pncP-do* benutzt (*proca-u-2263/52-290234r* bei *S. pneumoniae* Hu15, F4 und 632). Das *spi*-Cluster wurde mit *spiUP/pnc1r* amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe 2.10.11) und es wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.10.4). Anhand folgender Tabelle wurde die in die Sequenzierungsreaktion einzusetzende DNA-Menge bestimmt.

**Tabelle 17.** DNA-Menge in Verhältnis zur Länge des PCR-Produktes. Quelle: ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer; Sequencing Chemistry Guide; 2001 Applied Biosystems.

Template	Template-Menge
PCR-Produkte:	
100 – 200 bp	1 – 3 ng
200 – 500 bp	3 – 10 ng
500 – 1000 bp	5 – 20 ng
1000 – 2000 bp	10 – 40 ng
> 2000 bp	40 – 100 ng
einzelsträngige DNA	50 – 100 ng
doppelsträngige DNA	200 – 500 ng
Cosmide, BAC	0,5 – 1,0 µg
genomische DNA	2 – 3 µg

Da die PCR-Produkte beider Cluster größer als 2000 bp sind, wurde ca. 50 ng in die Sequenzreaktion eingesetzt.

**Tabelle 18.** Pipettierschema für eine Sequenzierungsreaktion mit dem ABI Terminator Ready Reaction Mix 3.11, ABI.

Sequenzierprimer (5 pmol/µl)	1 µl
Template (PCR-Produkt)	2 – 5 µl
ABI Terminator Ready Reaction Mix 3.11	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 10 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Die Sequenzierung wurde in einem Biometra PersonalCycler durchgeführt. Dabei wurde folgendes Programm genutzt.

**Tabelle 19.** Temperaturprofil für eine Sequenzierungsreaktion mit einem UNO 40 Thermoblock, Biometra (Deutschland).

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
1	Denaturierung	96°C	10 sec	25
2	Annealing	50°C	5 sec	
3	Elongation	60°C	4 min	
4	Pause	10°C		

Neben diesen langen PCR-Fragmenten wurden zur besseren Abdeckung auch kleine Fragmente sequenziert. Dazu wurden von der chromosomalen DNA der zu sequenzierenden Stämme mit Hilfe einer PCR überlappende Fragmente einer Größe von 1000 bis 2000 bp amplifiziert. Als Grundlage für die Auswahl und Positionierung der Primer dienten die *spi*- und *pnc*-Cluster der Stämme *S. pneumoniae* TIGR4 und *S. pneumoniae* R6. Die Überlappung

der PCR-Produkte lag im Bereich von ca. 200 Basenpaaren, was eine fehlerfreie Assemblierung der einzelnen Reads ermöglicht. In Tabelle 5 sind alle verwendeten Primer aufgelistet. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt und in eine Sequenzreaktion (Tab. 18) eingesetzt. Die Menge an eingesetzter DNA korrelierte dabei mit der Länge des PCR-Produktes (siehe Tabelle 17). Als Sequenzierprimer wurde der Primer verwendet, mit dem auch die Amplifikation des PCR-Produktes erfolgte.

### **2.12.2 Analyse der DNA-Sequenzen**

Zur Assemblierung der durch die Sequenzreaktion erzeugten Reads wurde die Software phred/phrap/consed (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998) verwendet. Die auf dem erhaltenen Contig liegenden Open Reading Frames (ORFs) wurden mit Hilfe des NCBI ORFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>, Wheeler *et al.*, 2006) ermittelt und anschließend durch eine BLAST-Analyse (Altschul *et al.*, 1990) ihrer Nukleotid- und Proteinsequenz identifiziert.

Die Nukleotidsequenzen von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 wurden aus der Datenbank der NCBI Webseite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) geladen (Genbank-Nummer TIGR4: AE005672.2; R6: AE007317.1).

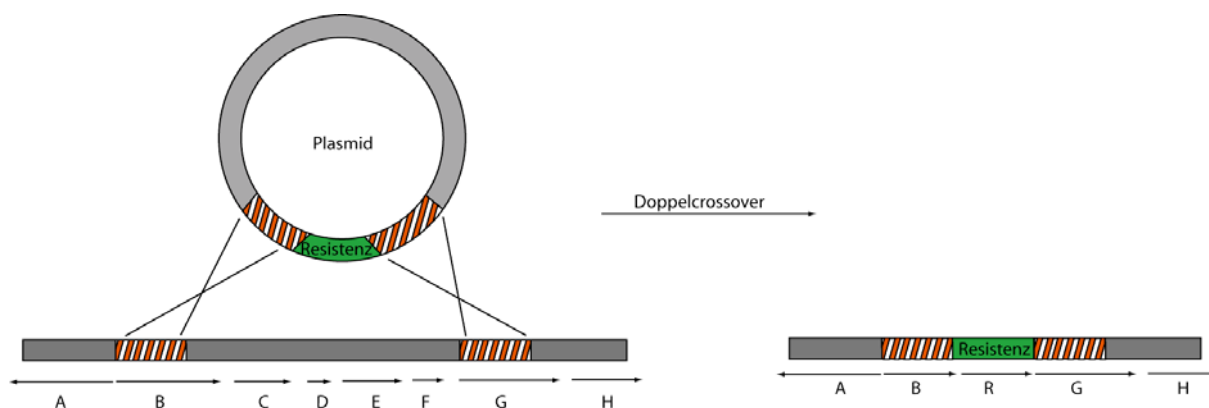
Die Bestimmung der Transmembranhelices (TMHs) erfolgte durch die Software TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, Krogh *et al.*, 2001; Sonnhammer *et al.*, 1998), die Isoelektrischen Punkte (pI) der Proteine wurden durch das Modul Compute pI/MW bestimmt ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)).

## **2.13 Klonierungsstrategien**

### **2.13.1 Darstellung des Plasmids pGEM-ASB zur Deletion der *pnc*-Gene**

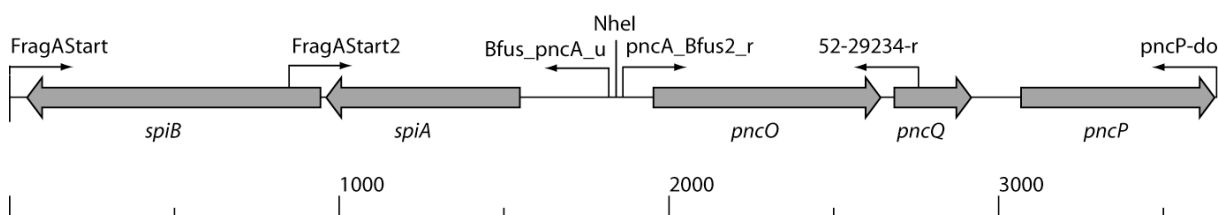
Die Deletion der Gene *pncR* bis *pncK* des Stammes *S. pneumoniae* 2306 sollte mit Hilfe eines Doppelcrossovers durchgeführt werden (siehe Abb. 8). In Abbildung 11 ist der genaue Ablauf der Vorgehensweise dargestellt.



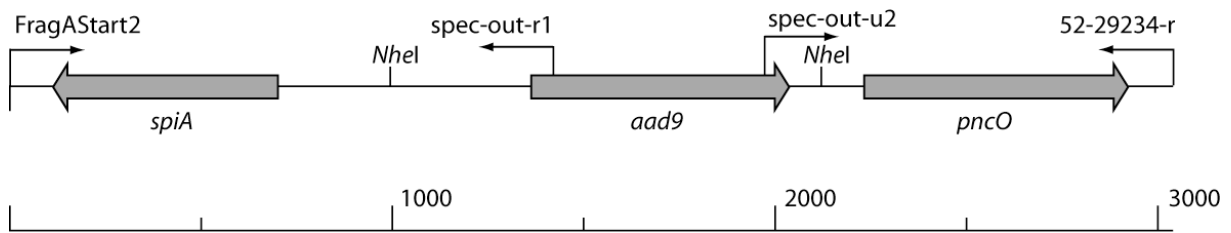


**Abbildung 8.** Schematische Darstellung der Deletion der Gene C, D, E und F durch ein Doppelcrossover. Die beiden Fragmente (schraffiert) auf dem Vektor rekombinieren mit ihren homologen DNA-Sequenzen B und G auf dem Genom. Dadurch wird der Resistenzmarker (R) ins das Genom integriert, und die zwischen den beiden homologen DNA-Fragmenten liegenden Gene deletiert und durch den Resistenzmarker ersetzt.

Dazu wurden zunächst zwei, die zu ersetzende *pnc*-Sequenz flankierende Bereiche über eine PCR amplifiziert. Der stromaufwärts liegende DNA-Abschnitt (Fragment A), auf dem sich die Gene *spiB* und *spiA* befinden, wurde mit dem Primerpaar FragAStart/*pncA\_Bfus2\_r* amplifiziert. Für das stromaufwärts liegende Fragment B wurden *Bfus\_pncA\_u* und *pncPdo* benutzt. Auf diesem Fragment befinden sich die Gene *pncO*, *pncQ* und *pncP* (siehe Abb. 9). Die Primer *pncA\_Bfus2* und *Bfus\_pncA\_u* besitzen eine sich überlappende Nukleotidsequenz von 25 Basen, d.h. die Sequenz des 3'-Endes des Primers *pncA\_Bfus2\_r* ist komplementär zu dem 5'-Ende des Primers *Bfus\_pncA\_u*. Außerdem enthalten die Primer eine Schnittstelle zum Verdau mit dem Restriktionsenzym *NheI*. Die beiden Fragmente wurden anhand der Sequenz des Stammes *S. pneumoniae* F4 entworfen, so dass später eventuell eine Deletion des Bacteriocin-Clusters in möglichst vielen Stämmen durchgeführt werden kann. Als Template für die PCR mit Goldstar Polymerase diente chromosomale DNA des Stammes *S. pneumoniae* 2306, die Annealing-Temperatur lag bei 42°C und die Elongations-Zeit bei 2 min 15 sec. Die amplifizierten Fragmente wurden mit Hilfe des JETQUICK-Kits (siehe 2.10.11) aufgereinigt und durch Agarosegel-Elektrophorese und Et-Br-Färbung in ihrer Größe verifiziert. Die Größe des Fragmentes A beträgt 1866 bp, die des Fragmentes B 1839 bp.

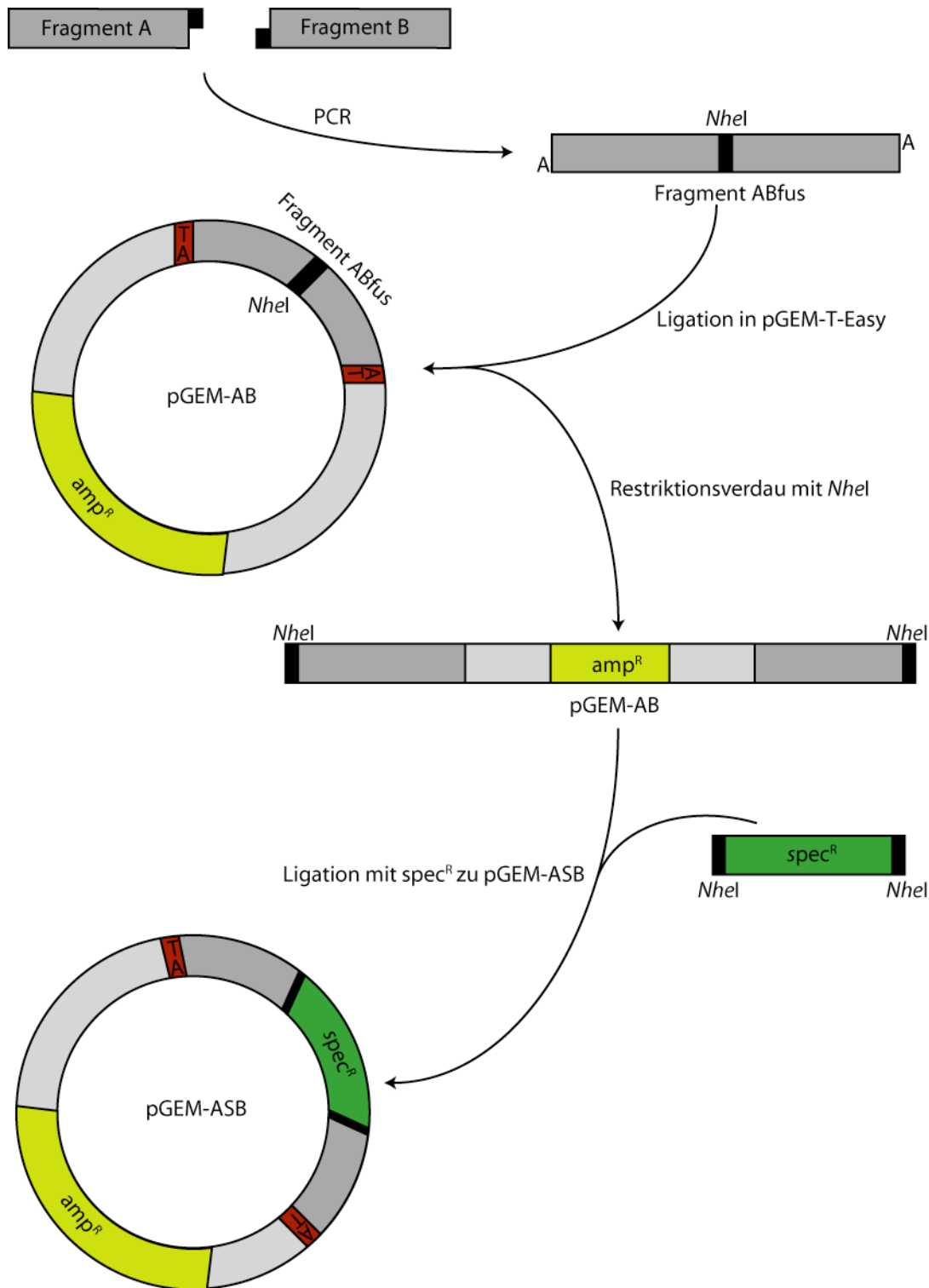


**Abbildung 9.** Schematische Darstellung der Lage der verwendeten Primer FragAStart, FragAStart2, *Bfus\_pncA\_u*, *pncA\_Bfus2\_r*, 52-29234-r und *pncP-do*, und die *NheI*-Restriktionsstelle auf den beiden Fragmenten A und B.



**Abbildung 10.** Darstellung der Lage der Primer FragAStart2, spec-out-r1, spec-out-u2, 52-29234-r und *NheI*-Schnittstellen in pGEM-ASB-1.

Beide Fragmente können über die durch die PCR eingeführten überlappenden Nukleotidsequenz miteinander verbunden werden. Dazu wurden Primer benutzt, die weiter innen auf den amplifizierten Fragmenten liegen. FragAStart2 liegt am Ende des Gens *spiB*, 52-29234-r liegt hinter *pncO*, im Gen *pncQ* (siehe Abb. 9). Als Template diente eine Mischung aus jeweils 1 µl aufgereinigten (um die Primer der vorausgegangenen PCR zu entfernen) Fragment A und B, die Annealing-Temperatur lag bei 45°C und die Elongations-Zeit bei 2 min 15 sec. Das dadurch erhaltene DNA-Fragment Fragment ABfus ist 1909 bp groß, besitzt eine *NheI*-Schnittstelle und umfasst die Gene *spiA* und *pncO*.



**Abbildung 11.** Schematische Darstellung der Konstruktion des Plasmids pGEM-ASB. Über überlappenden Nukleotidsequenzen werden die Fragmente A und B zu dem Fragment ABfus verbunden. Anschließend wird ABfus über T-Überhänge in das Plasmid pGEM-T-Easy (Promega, USA) kloniert, und das neue Plasmid pGEM-AB mit *NheI* geschnitten. Das Spectinomycinresistenzgen *aad9* wird mit *NheI* aus dem Plasmid pCR-spec herausgeschnitten und mit pGEM-AB zu pGEM-ASB ligiert.

Nach einer Aufreinigung mit dem JETQUICK-Kit wurde das Fragment ABfus in das Plasmid pGEM-T-Easy (Promega, USA) kloniert (siehe 2.11.2). Dieses erfolgte über eine

Elektroporation kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes JM109 (siehe 2.11.1). Als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml benutzt. Das entstandene neue Plasmid wurde pGEM-AB genannt. Durch eine Blau/Weiß-Selektion (siehe 2.11.3) konnten die Klone, die ein Plasmid mit Insert, also das PCR-Produkt ABfus, enthalten von anderen Klonen unterschieden werden. 60 weiße Mutanten wurden gepickt und in 4 Gruppen von jeweils 15 Klonen auf das Vorhandensein des Insert durch eine PCR (Annealing-Temperatur: 50°C; Elongations-Zeit: 2 min 15 sec) mit den Primern FragAStart2 und 52-29234-r überprüft. Die als Template benutzte DNA wurde aus *E. coli*-Zell-Lysaten gewonnen (siehe 2.10.9).

Für die folgende Insertion des Resistenzgens *aad9* spielt die Orientierung keine Rolle, da die Klonierung der Resistenzkassette ebenfalls ungerichtet abläuft. Von 4 Plasmiden des Pools 4 wurde nach einer Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (siehe 2.10.8) ein Restriktionsverdau mit *NheI* durchgeführt. Dazu wurden 45 µl Plasmid-DNA und 10 µl Puffer M verwendet (siehe 2.10.5). Die Inkubationszeit betrug 2,5 h bei 37°C. Anschließend wurde zur Kontrolle eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Durch den Verdau mit *NheI* werden alle Plasmide linearisiert. Ihre Größe beträgt ca. 5 kb, was der errechneten Plasmidgröße (pGEM-T-Easy 3 kb + ABfus 2 kb) entspricht. Die „supercoiled“-Form von pGEM-AB zeigt sich auf dem Gelbild bei ca. 3 kb. Darauf folgend wurde das Restriktionsenzym *NheI* durch Erhitzen des kompletten Ansatzes auf 65°C für 30 Minuten inaktiviert, die Plasmid-DNA mit Glykogen/Ethanol (siehe 2.10.2) präzipitiert und in 5 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

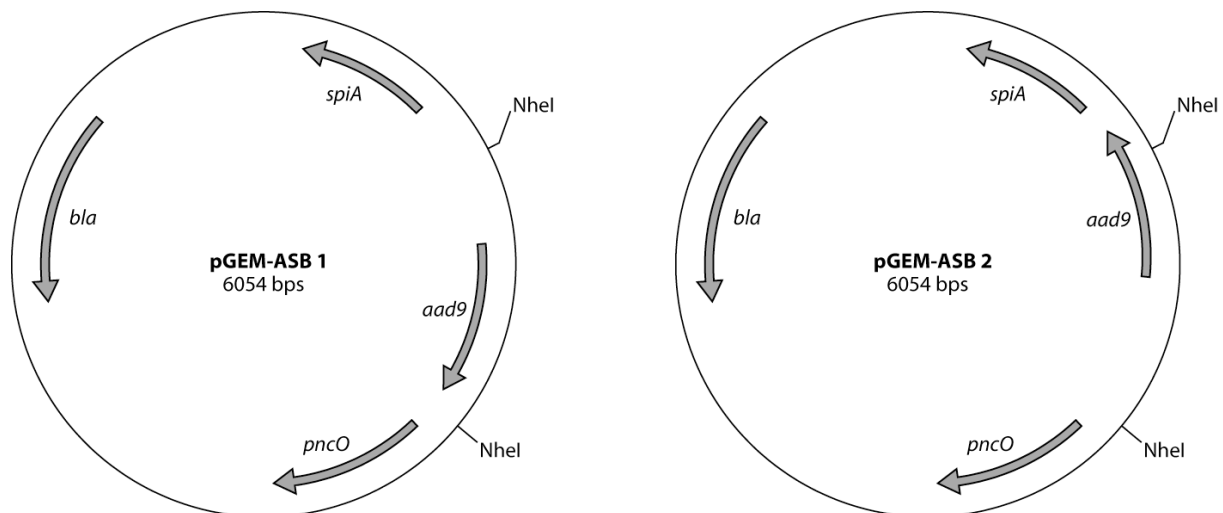
Das Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* wurde durch einen *NheI*-Verdau aus dem Plasmid pCR-spec (Zähner *et al.*, 2002) ausgeschnitten (siehe Abbildung 11). Dazu wurde analog, wie oben beschrieben (*NheI*-Verdau von pGEM-AB), vorgegangen. Die Spectinomycin-Kassette besitzt eine Größe von 1158 bp. Aufgereinigt wurde der Restriktionsverdau durch eine präparative Gelextraktion mit dem JETQUICK Plasmid/PCR/Gel Extraktion Kit nach den Angaben des Herstellers. 2 µl der Spectinomycin-Kassette und 2 µl linearisiertes Plasmid pGEM-AB wurden gemischt und über Nacht bei 4°C ligiert (siehe 2.10.6). Der Ligationsansatz wurde anschließend gefällt und in *E. coli* JM109 transformiert (siehe 2.11.1). Das erhaltene Plasmid wurde pGEM-ASB genannt. Als Selektionsmarker dienten Erythromycin [1 µg/ml] sowie Spectinomycin [80 µg/ml]. Bei dieser Klonierung kann keine Identifizierung richtiger Klone durch Blau/Weiß-Selektion angewandt werden. Deshalb wurden 160 Einzelkolonien gepickt und auf LB-Platten mit Spectinomycin [80 µg/ml]

übertragen, wodurch nur solche Klone selektioniert werden, welche die in pGEM-ASB klonierte Spectinomycin-Resistenz besitzen.

Die Spectinomycin-Kassette kann durch die *NheI*-Schnittstellen in zwei Richtungen in das Plasmid pGEM-AB integrieren. Abbildung 12 zeigt beide Möglichkeiten der Orientierung. Jedoch sollte nur mit dem Plasmid weitergearbeitet werden, bei dem die Leserichtung der Gene *aad9* und *pncO* gleich ist. Dazu wurden 10 Klone gepickt und die Orientierung der Spectinomycin-Kassette wurde mit Hilfe einer Goldstar® PCR überprüft. Die Tabelle 20 stellt die sowohl die Primer, als auch die errechnete Größe der amplifizierten Produkte dar.

**Tabelle 20.** Größen der PCR-Produkte zur Überprüfung der Orientierung der Spectinomycin-Kassette in pGEM-ASB.

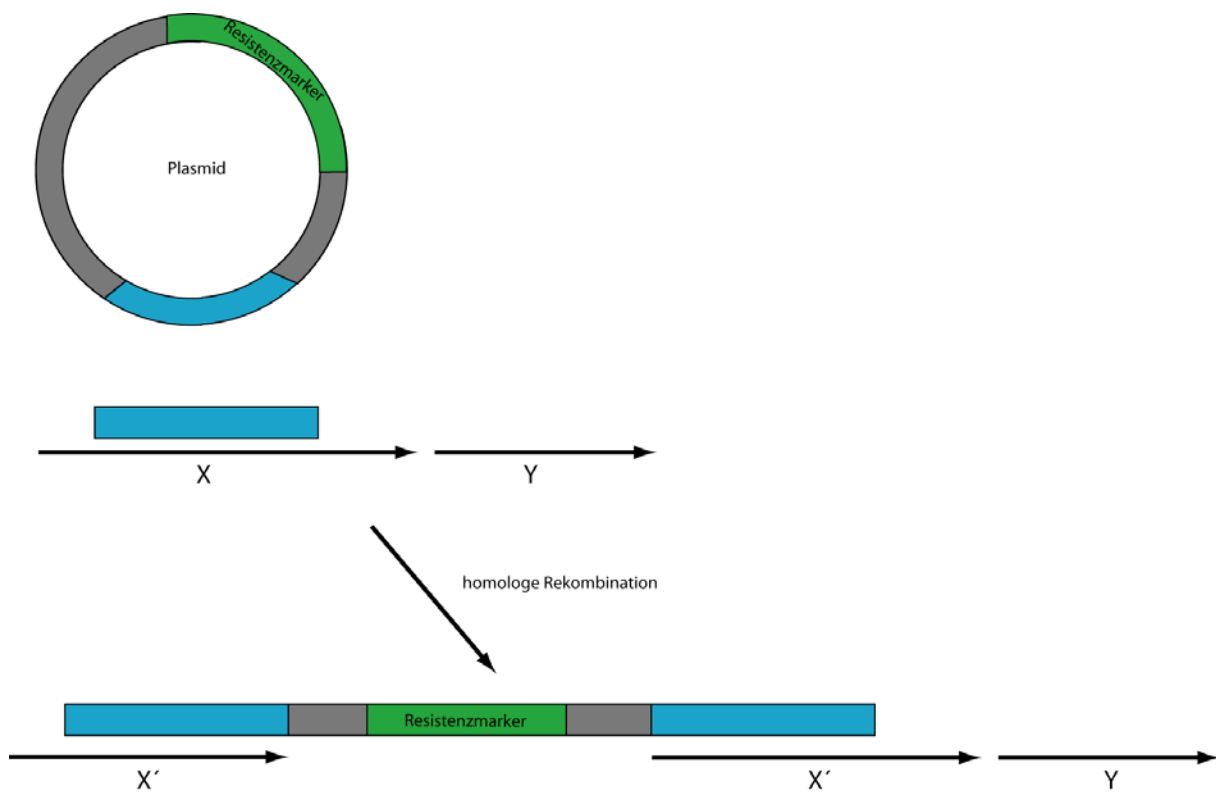
	Primer	Plasmid pGEM-ASB-1	Plasmid pGEM-ASB-2
1.	FragAStart2/spec-out-r1	1,2 kb	800 bp
2.	FragAStart2/spec-out-u2	300 bp / 500 bp	1,2 kb
3.	M13-universal (-21)/spec-out-r1	1,3 kb	-
4.	M13-universal (-21)/spec-out-u2	400 bp	1,3 kb
5.	M13-reverse (-49)/spec-out-r1	450 bp	1,4 kb
6.	M13-reverse (-49)/spec-out-u2	1,2 kb	-
7.	52-29234-r/spec-out-r1	1,2 kb	1,2 kb
8.	52-29234-r/spec-out-u2	1 kb	2 kb



**Abbildung 12.** Darstellung der beiden möglichen Orientierungen des Spectinomycin-Resistenzgenes in dem Plasmid pGEM-ASB. Einmal in Leserichtung des *pnc*-Clusters (pGEM-ASB-1) und einmal entgegen der Leserichtung des *pnc*-Clusters, in Richtung *spiA* (pGEM-ASB-2). Das Gen *bla* codiert für eine  $\beta$ -Lactamase, die Resistenz gegen Ampicilin vermittelt. Ebenso wurden die *NheI*-Schnittstellen eingezeichnet.

### 2.13.2 Darstellung der Plasmide pJDR1, pJDB2 und pJDO3

Zur Untersuchung des Einflusses des Zwei-Komponenten-Systems *spi* an der Regulation der Bacteriocinproduktion wurden Mutanten in den Genen *spiB* und *spiR2* hergestellt. Diese besitzen entweder funktionslose Varianten des ABC-Transporters (im Falle von *spiB*) oder des Responseregulators (im Falle von *spiR2*). Zusätzlich wurde noch das Gen *pncO*, welches für eine Protease der CAAX-Familie codiert, inaktiviert. Das Ausschalten der Gene erfolgte nach dem Prinzip der Insertionsduplikation (Mejean *et al.*, 1981). Dazu wird ein internes Fragment des auszuschaltenden Genes via PCR amplifiziert und in ein Plasmid integriert (Lee *et al.*, 1998). Transformiert man nun den Zielstamm mit dem Plasmid, findet ein Rekombinationsereignis über das homologe DNA-Fragment statt. Dabei wird dieses Fragment dupliziert und das Gen durch Integration des Plasmids funktionell ausgeschaltet (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13.** Darstellung des Ablaufs einer Insertionsduplikation. Das in das Plasmid ligierte interne DNA-Fragment von Gen X wird durch homologe Rekombination in das Genom integriert. Dabei wird das Fragment dupliziert und durch Integration der Plasmidsequenz das Gen X inaktiviert. Der auf dem Plasmid vorhandene Resistenzmarker integriert mit dem Plasmid in das Genom, so dass Transformanten mit inaktiviertem Gen X identifiziert werden können.

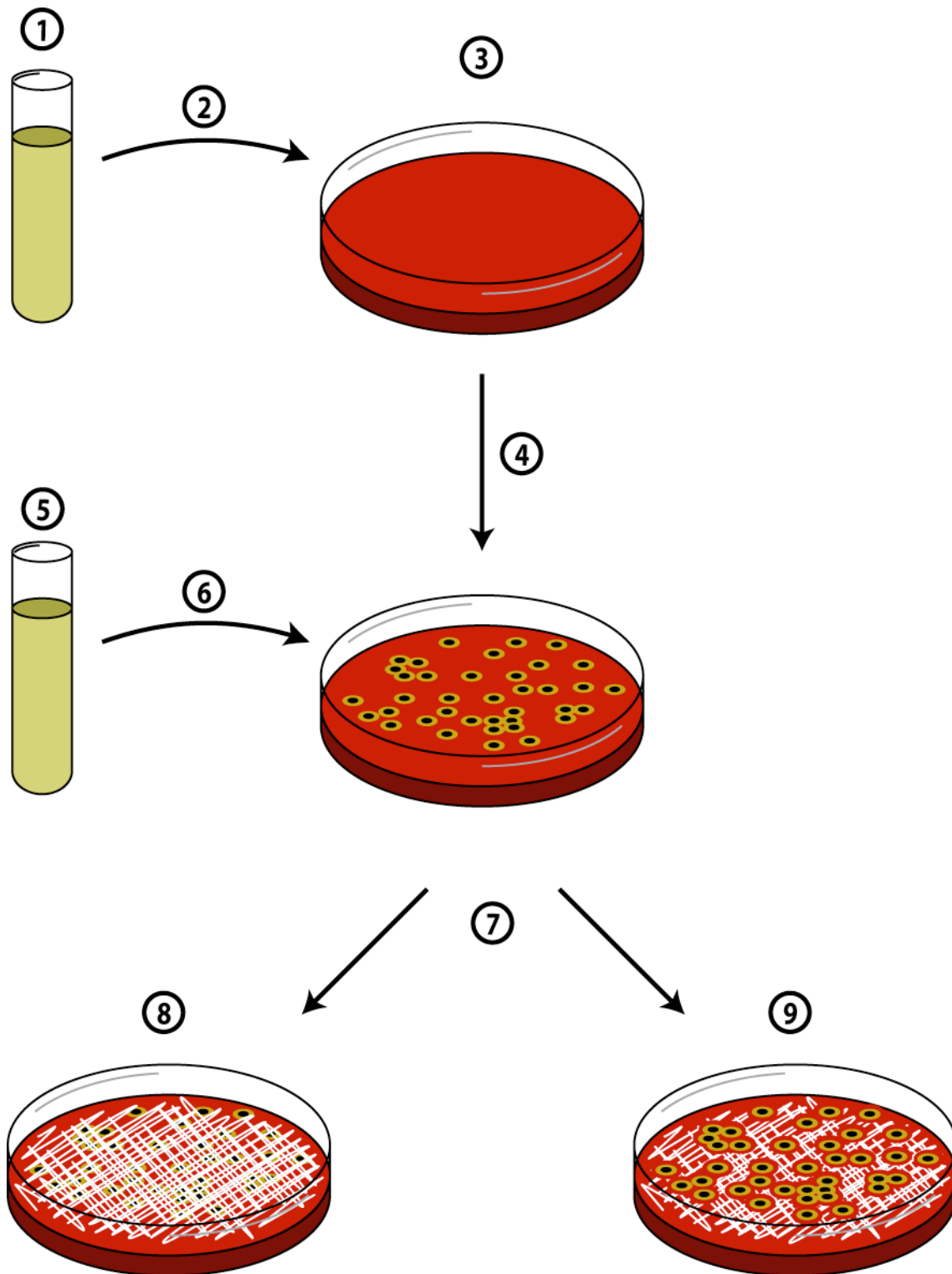
Die Konstrukte wurden von Dr. Peter Reichmann hergestellt, weswegen die Arbeitsschritte nur kurz beschrieben werden.

Die Amplifikation der homologen Fragmente erfolgte durch die Goldstar Polymerase mit den Primern rr13id2u-1676/rr13id2r-17109 (*spiR2*), ca2-u-21467/ca2-r-21811 (*spiB*) und pncosd-up/52-29234-r (*pncO*). Als Template diente chromosomale DNA von *S. pneumoniae* R6. Die entstanden Fragmente wurden in das pGEM-T-Easy Vektorsystem kloniert, und nach einem Verdau mit *EcoRI* (in Puffer H) in das Plasmid pJDC9, welches vorher ebenfalls mit *EcoRI* geschnitten wurden, umklont. Die entstanden Konstrukte wurden folgendermaßen benannt:

pJDR1	pJDC9 mit <i>spiR2</i> -Fragment
pJDB2	pJDC9 mit <i>spiB</i> -Fragment
pJDO3	pJDC9 mit <i>pncO</i> -Fragment

## 2.14 Bacteriocin-Assay

Um die Produktion von Bacteriocinen durch einen Bakterienstamm nachzuweisen wurde ein Platten-Assay durchgeführt. Dazu wurden in der Literatur beschriebene und zum Nachweis von Bacteriocinen in Lactokokken etablierte Systeme adaptiert (Brurberg *et al.*, 1997; Diep *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 2001; Eijsink *et al.*, 1996; Mindich, 1966; Tagg & McGiven, 1971). Dieser besteht aus einer Schicht aus 15 ml D-Agar auf der der auf Bacteriocinproduktion zu testenden Bakterienstamm (80 bis 100 Kolonien) aufgebracht wird, und einer Deckschicht aus 10 ml D-Agar auf der, nach 16 Stunden Inkubation bei 35°C in einem Kerzentopf, die Indikatorbakterien ausplattiert wurden. Nach weiteren 16 Stunden Inkubation bei 35°C im Kerzentopf wurde der Platten-Assay ausgewertet. Eine Bacteriocinproduktion des Test-Stammes stellt sich als Wachstumshemmung, d.h. kreisförmige Inhibitionszonen um die Test-Stammkolonien, des Indikatorstammes dar (positiver Bacteriocinphänotyp). Wurde keine Hemmung beobachtet und der Indikatorstamm bildet einen Rasen auf der Agarplatte, ist dies ein negativer Bacteriocinphänotyp (keine Produktion von Bacteriocinen). Dabei wurde eine Bacteriocinproduktion mit einem Plus-Zeichen (+) angegeben. Eine besonders klare Hemmung wurde mit (++) bewertet und wurde keine Hemmung festgestellt, wurde dies durch ein Minus-Zeichen (-) gekennzeichnet. Alle Versuche wurden als Doppelansatz durchgeführt, sowie mindestens dreimal unabhängig voneinander (inklusive Kontrollen) wiederholt. Die Platten wurden auf einem Leuchttisch mit einem digitalem Platten-Dokumentations-System fotografiert (Digital Interface DFW-X700 [Sony, Japan], Lucia Image [Laboratory Imaging, Tschechische Republik] und Nikkor 24 mm f/2.8D [Nikon, Japan]).



**Abbildung 14.** Schematische Darstellung der Durchführung eines Bacteriocin-Assays: 100  $\mu$ l einer Übernachtskultur (1) des auf Bacteriocinproduktion zu testenden Stammes werden auf eine Schicht aus 15 ml Blutagar aufgebracht (2,3), mit 10 ml Blutagar überschichtet und für 16 Stunden bei 35°C in einem Kerzentopf inkubiert (4). Der Indikatorstamm (50  $\mu$ l) wird ausplattiert (5,6). Anschließend erfolgt eine weitere Inkubation bei 35°C für 16 Stunden im Kerzentopf (7). Wächst der Indikatorstamm ganzflächig über die Assay-Platte, so ist dies ein negativer Bacteriocinphänotyp (8). Bilden sich jedoch Hemmhöfe, so besitzt der Teststamm einen positiven Bacteriocinphänotyp (9).



#### Durchführung des Assays:

- 10 ml C-Medium werden mit 100 µl einer Übernachtskultur des auf Bacteriocinproduktion zutestenden Bakterienstammes angeimpft (1).
- Bei einem Nephelo-Wert zwischen 30 und 35 wird eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-5}$  durchgeführt. Dabei werden 50 µl der Kultur in 4950 µl Saline überführt ( $10^{-2}$ ). Dieser Schritt wird wiederholt ( $10^{-4}$ ) und 1 ml dieser Verdünnungsstufe werden in 9 ml Saline gegeben ( $10^{-5}$ ) (2).
- 50 µl dieser Verdünnungsstufe werden auf der D-Agar-Unterschicht ausplattiert (3).
- Nach einer 30 minütigen Trocknungszeit wird die Unterschicht mit 10 ml D-Agar überschichtet und in einen Kerzentopf gestellt (4).
- Nach einer 16 stündigen Inkubationsdauer bei 35°C werden 50 µl des beginnend exponentiell-wachsenden Indikatorstammes (Nephelo-Wert N=30) (5) auf die Oberschicht plattiert (6).
- Einer 5 minütigen Trocknungszeit folgend wird die Assay-Platte wieder für 16 Stunden in einem Kerzentopf bei 35°C inkubiert (7).
- Anschließend findet die Auswertung statt. Bilden sich Hemmhöfe um die Indikatorbakterien, so produziert der getestete Bakterienstamm Bacteriocine (9).
- Bildet der Indikatorstamm einen einheitlichen Rasen, so produziert der getestete Bakterienstamm keine gegen den Indikatorstamm wirksamen Bacteriocine (8).

### 3. Ergebnisse

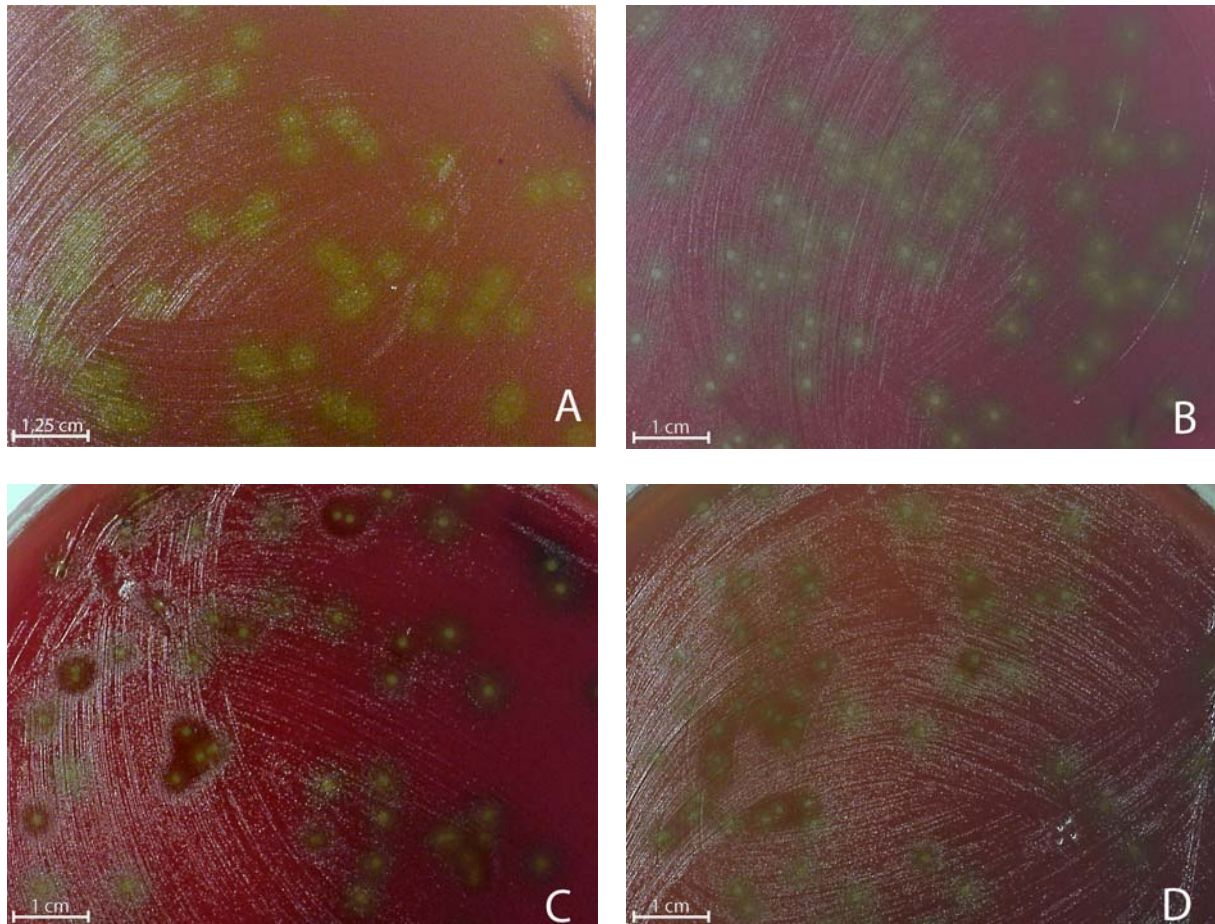
Im Folgenden werden verschiedene Aspekte der Bacteriocinproduktion untersucht. Zunächst wurden verschiedene *S. pneumoniae* Isolate in einem biologischen Test auf mögliche Bacteriocinaktivität gescreent. Von ausgewählten Isolaten wurden DNA Sequenzanalysen des gesamten Bacteriocinclusters durchgeführt. Um schließlich die Bedeutung der verschiedenen Gengruppen funktionell zu analysieren wurden Mutanten generiert, und letztendlich sollten Expressionsstudien an einzelnen Genen Aspekte der Regulation verifiziert werden.

#### 3.1 Bacteriocinproduktion

##### 3.1.1 Bacteriocinproduktion in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4

Gene für Bacteriocin-ähnliche Peptidsequenzen waren in den zwei *S. pneumoniae* Stämmen beschrieben, deren annotierte Genomsequenzen als erste zur Verfügung standen (siehe 1.5), welche über das Zwei-Komponenten-System *spi* reguliert werden: *S. pneumoniae* TIGR4 (de Saizieu *et al.*, 2000) und R6 (Reichmann & Hakenbeck, 2000). In der Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern ist ein biologischer Assay entwickelt worden, mit dem eine Bacteriocinproduktion in *S. pneumoniae* Stämmen nachgewiesen werden kann. Damit konnte der Zusammenhang zwischen den produzierten Bacteriocinen und deren biologischer Aktivität hergestellt werden.

Mit dem in 2.14 beschriebenen Assay wurden der nichtpathogene Laborstamm *S. pneumoniae* R6, sowie der pathogene Stamm *S. pneumoniae* TIGR4 auf Bacteriocinproduktion hin getestet. Als Indikatoren wurden die beiden Bakterien *Micrococcus luteus* und *Lactococcus lactis* verwendet. Diese gelten als sensitiv gegen Bacteriocine anderer Bakteriengattungen und werden oft als Indikatorbakterien für den Nachweis von Bacteriocinen bei Lactokokken eingesetzt (Tagg & Bannister, 1979). Die Tabelle 21 und die Abbildungen 15A bis 15D stellen die Ergebnisse dar.



**Abbildung 15.** Bacteriocinproduktion von *S. pneumoniae* R6 gegen den Indikatorstamm *Lactococcus lactis* (A); *S. pneumoniae* R6 gegen *Micrococcus luteus* (B); *S. pneumoniae* TIGR4 gegen *L. lactis* (C); *S. pneumoniae* TIGR4 gegen *M. luteus* (D). Die Platten wurden 16 Stunden nach Applikation des Indikatorstammes fotografiert.

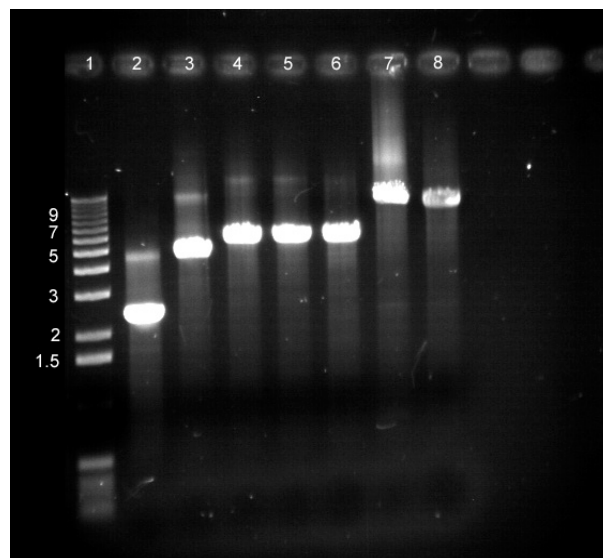
Betrachtet man die Platten von *S. pneumoniae* R6, so sieht man einen von den Indikatorbakterien gebildeten Bakterienrasen, der die komplette Assay-Platte bedeckt. Unter diesem Rasen sind die eingegossenen Kolonien von *S. pneumoniae* R6 zu erkennen (Abbildungen 15A, 15B).

Ein anderes Bild zeigt sich, wenn man die Platten von *S. pneumoniae* TIGR4 betrachtet. Um die im Agar eingebetteten Kolonien bildeten sich kreisförmige Zonen in welchen kein Wachstum der Indikatorbakterien auftrat. Der Stamm bewirkte somit eine Wachstumshemmung der Indikatorbakterien im Umkreis der eingebetteten Kolonien. Befanden sich keine Kolonien von *S. pneumoniae* TIGR4 unter bzw. in der Nähe, zeigten die Indikatorbakterien normales Wachstum und bildeten einen dichten Belag. Diese Hemmung trat sowohl bei *M. luteus* (Abb. 15D) wie auch bei *L. lactis* (Abb. 15C) auf (Tabelle 21).

### 3.1.2 Screening nach bacteriocinproduzierenden Streptokokken

Für eine Untersuchung der Verbreitung der Produktion von Bacteriocinen unter Pneumokokken wurden die Stämme *S. pneumoniae* 456, 496, 632, 638, 653, 667, 673, 674, 2349, F4, F10, F11, F12, F13, F14, F15, SA16 und SA17 des Serotyps 23F ausgewählt. Dabei handelt es sich um Isolate eines multi- und hoch Penicillin-resistenten spanischen Klons (Spain<sup>23F</sup>-1) aus verschiedenen Ländern, um zu sehen, ob innerhalb eines Klons Bacteriocinproduktion eine stabile Eigenschaft darstellt. Neben diesen wurden genetisch verschiedene Stämme verwendet: *S. pneumoniae* 2306, ebenfalls Serotyp 23F, aber penicillin-sensitiv, finnischer Herkunft und somit genetisch unterschiedlich zum spanischen 23F-Klon, *S. pneumoniae* 628 (Serotyp 9V, Spain<sup>9V</sup>-3) aus Spanien und *S. pneumoniae* Hu15 (Serotyp 19A, Hungary<sup>19A</sup>-6) aus Ungarn ausgewählt. Beide sind multiresistent und die drei letztgenannten nachgewiesenermaßen transformierbar.

Da von keinem der oben genannten Stämme Sequenzinformationen der betreffenden Region vorlagen, wurde zuerst in allen Stämmen versucht, das *pnc*-Cluster mittels PCR zu amplifizieren. Dazu wurde eine Long Range-PCR (siehe 2.9.2) mit chromosomaler DNA (siehe 2.10.1) und Primern (proca-u-22363, pncP-do), die außerhalb der *pnc*-Gene liegen und auf den bekannten Sequenzen von R6 und TIGR4 basieren, durchgeführt (Abbildung 16).



**Abbildung 16.** PCR-Produkte der vermutlichen Bacteriocin-Cluster. Die Abbildung zeigt ein EtBr-gefärbtes Agarosegel der mit proca-u-22363 und pncP-do amplifizierten möglichen *pnc*-Cluster folgender Stämme: 1kb Ladder-Marker (Invitrogen) (1); *S. pneumoniae* R6 (2); *S. pneumoniae* Hu15 (3); *S. pneumoniae* F4 (4); *S. pneumoniae* 632 (5); *S. pneumoniae* 2306 (6); *S. pneumoniae* 628 (7) und *S. pneumoniae* TIGR4 (8).

In allen untersuchten Stämmen war es möglich mit stromab- bzw. stromaufwärts des *pnc*-Clusters liegenden Primern ein PCR-Produkt zu erhalten. Jedoch variierten die Größen der

amplifizierten DNA-Fragmente. Die Größe der Produkte von *S. pneumoniae* R6, sowie *S. pneumoniae* TIGR4 (Serotyp 4) stimmten mit der anhand der Genomsequenzen ermittelten Länge überein (2,5 kb bzw. 8,0 kb). In allen Stämmen des Serotyps 23F konnte ein ca. 5,9 kb großes Produkt amplifiziert werden. *S. pneumoniae* Hu15 (Serotyp 19A) besitzt ein ca. 4,0 kb, und *S. pneumoniae* 628 (Serotyp 9V) besitzt ein PCR-Produkt der Größe von 8,0 kb.

Nachdem bei allen untersuchten Stämmen mit *pnc*-spezifischen Primern ein PCR-Produkt erhalten wurde, wurden sie mit Hilfe des Platten-Assays auf Bacteriocinproduktion hin untersucht. Als Indikatorbakterien wurden *Micrococcus luteus* und *Lactococcus lactis* benutzt. *S. pneumoniae* R6 diente als Negativ-, *S. pneumoniae* TIGR4 als Positivkontrolle. Tabelle 21 listet die Ergebnisse auf.

**Tabelle 21.** Bacteriocinphänotyp der untersuchten Streptokokken-Isolate unterschiedlicher Serotypen gegen *M. luteus* bzw. *L. lactis*. Eine Bacteriocinproduktion wurde mit einem Plus-Zeichen (+) angegeben. Eine besonders klare Hemmung wurde mit (++) bewertet und wurden keine Hemmhöfe entdeckt, also keine Bacteriocinproduktion festgestellt, wurde dies durch ein Minus-Zeichen (-) gekennzeichnet.

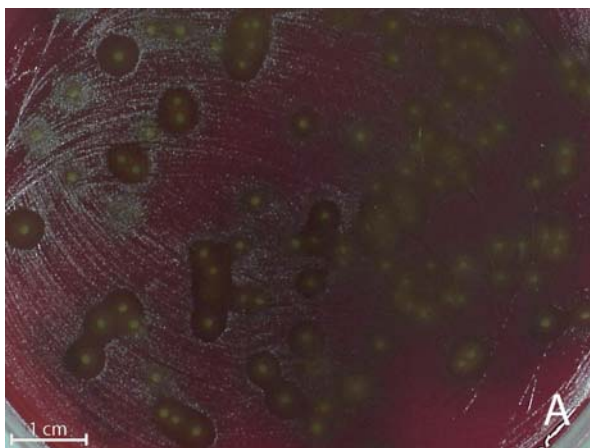
Stamm	Serotyp	Bacteriocinproduktion gegen Indikatorstamm	
		<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	4	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 628	9V	+	+
<i>S. pneumoniae</i> Hu15	19A	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 496	19F	++	++
<i>S. pneumoniae</i> 456	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 632	23F	++	++
<i>S. pneumoniae</i> 637	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 638	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 653	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 667	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 673	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 674	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 677	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> SA16	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> SA17	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> F4	23F	++	++
<i>S. pneumoniae</i> F10	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> F11	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> F12	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> F13	23F	-	-
<i>S. pneumoniae</i> F14	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> F15	23F	+	+
<i>S. pneumoniae</i> 2306	23F	++	++

Bei zwölf Isolaten konnte eine Bacteriocinproduktion nachgewiesen werden. Dabei war die Wahl des Indikatorbakteriums nicht entscheidend für das Auftreten einer

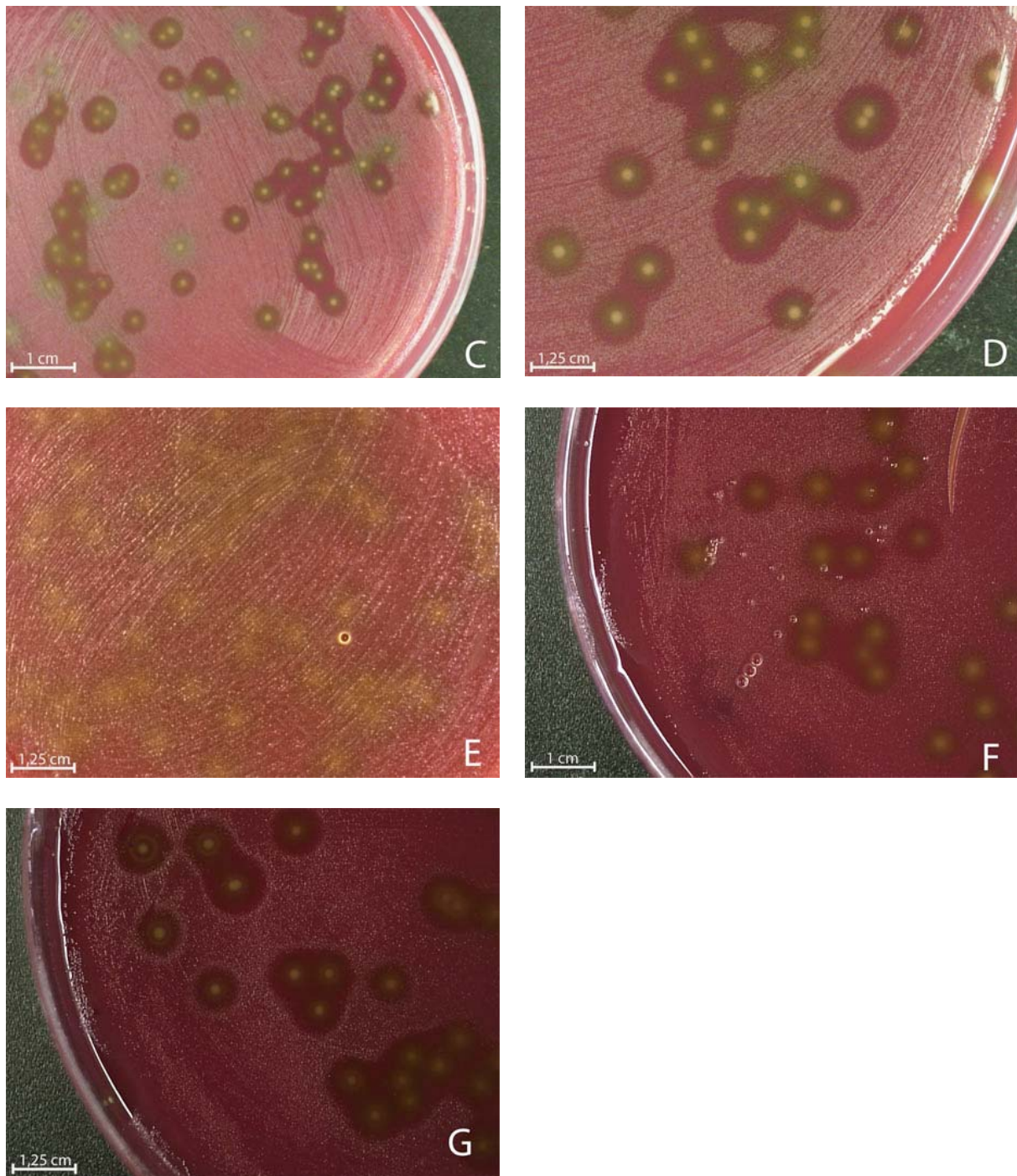
Bacteriocinproduktion. Wurde *M. luteus* im Wachstum gehemmt, zeigte sich auch eine Hemmung bei *L. lactis* und umgekehrt. Es wurde nicht beobachtet, dass nur eines der verwendeten Indikatorbakterien gehemmt wurde.

Innerhalb des spanischen 23F-Klons wurden sowohl Nichtproduzenten (10 Stämme), als auch Produzenten (8 Stämme) gefunden, obwohl für alle Stämme ein gleich großes PCR-Produkt mit an das *pnc*-Cluster eingrenzenden Primern, aus deren chromosomalen DNA-Extrakten amplifiziert werden konnte. *S. pneumoniae* 628, dessen PCR-Produkt die gleiche Größe wie *S. pneumoniae* TIGR4 besitzt, zeigte wie dieser ebenfalls eine Bacteriocinproduktion (Abb. 17A). Keine Bacteriocinproduktion konnte bei *S. pneumoniae* Hu15 (Abb. 17B) festgestellt werden, der das kleinste PCR-Produkt aller untersuchten Stämme enthält.

Nicht nur die Bacteriocinproduktion war unterschiedlich, es gab auch Unterschiede in der Stärke der Hemmwirkung. Diese Unterschiede zeigten sich am deutlichsten bei der Hemmung von *L. lactis*. Dieser hob sich durch seine weißen Kolonien gut von der roten Farbe des Agars ab und konnte so besser fotografiert werden. Weiterhin war die Hemmung von *M. luteus* bei allen Stämmen immer sehr deutlich, so dass keine genauen Abstufungen vorgenommen werden konnte. Eine im Vergleich zu *S. pneumoniae* TIGR4 deutlichere Wachstumshemmung zeigten *S. pneumoniae* 632 (Abb. 17D), *S. pneumoniae* F4 (Abb. 17F), *S. pneumoniae* 496 (Abb. 17C), die alle Mitglieder des spanischen 23F Klons sind, und der Stamm *S. pneumoniae* 2306 des finnischen 23F Klons (Abb. 17G).







**Abbildung 17.** Bacteriocinproduktion verschiedener *S. pneumoniae* Stämme: *S. pneumoniae* 628 (A); *S. pneumoniae* Hu15 (B); *S. pneumoniae* 496 (C); *S. pneumoniae* 632 (D); *S. pneumoniae* 653 (E); *S. pneumoniae* F4 (F); *S. pneumoniae* 2306 (G). Als Indikatorbakterium wurde *L. lactis* verwendet.

### 3.1.3 Auswirkungen der Veränderungen der Wachstumsbedingungen auf die Bacteriocinproduktion

Bei über Quorum sensing gesteuerten Genexpressionen, wie der Kompetenz oder der Ausbildung von Biofilmen, spielen Wachstumsbedingungen wie die Umgebungstemperatur oder das CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis eine entscheidende Rolle (Hoyle & Costerton, 1991; Lacks &

Greenberg, 2001). Ob unterschiedliche Wachstumsbedingungen auch die Produktion von Bacteriocinen beeinflussen wurde mit folgenden Experimenten untersucht.

### **Inkubationstemperatur**

Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Bacteriocinproduktion sollte untersucht werden. Dazu wurde der Bacteriocin-Assay bei 37°C und 35°C parallel durchgeführt. 37°C wurde gewählt, da dieses die optimale Inkubationstemperatur von *S. pneumoniae* darstellt, während 35°C eine Annäherung an die im natürlichen Habitat (Nasenraum) vorkommende Temperatur ist. Als Teststämme wurden der Laborstamm *S. pneumoniae* R6, der pathogene Stamm *S. pneumoniae* TIGR4, zwei Vertreter des 23F-Stammes mit unterschiedlichen Bacteriocinphänotypen *S. pneumoniae* 632 (positiv), *S. pneumoniae* 653 (negativ) und der transformierbare und bacteriocinproduzierende Stamm *S. pneumoniae* 2306 ausgewählt. Dabei zeigte sich, dass bei 35°C *S. pneumoniae* TIGR4, *S. pneumoniae* 632 und *S. pneumoniae* 2306 einen positiven Bacteriocinphänotyp aufweisen, während bei 37°C, bis auf einen reduzierten Phänotyp von *S. pneumoniae* 2306, keiner der ausgewählten Stämme Bacteriocine produzierte.

### **CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Verhältnis**

Wie für die genetische Kompetenz (*com*-System) bei *S. pneumoniae* gezeigt beeinflusst das CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis der Umgebungsluft die Transformationseffizienz (Lacks & Greenberg, 2001). Da die Kompetenz ebenfalls über ein Zwei-Komponenten-System reguliert wird, sollten die Auswirkungen unterschiedlicher CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnisse auf die Bacteriocinproduktion untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Ansätze des Assays bei 35°C durchgeführt. Zum einen wurden die Platten ohne Kerzentopf (entspricht dem CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis der Umgebungsluft) inkubiert. Zum anderen wurde der Kerzentopf mit CO<sub>2</sub> aus einer Druckflasche befüllt, verschlossen und inkubiert (entspricht fast reiner CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). Als Kontrolle wurde der Assay wie in 2.14 beschrieben durchgeführt (entspricht verminderter O<sub>2</sub>-Konzentration).

Es zeigte sich eine Bacteriocinproduktion nur in dem Experiment, welches in welchem die O<sub>2</sub>-Konzentration durch Verbrennen der Kerze verringert wurde. Es wurde keine Produktion bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration oder normaler CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Konzentration der Umgebungsluft beobachtet. In normaler Umgebungsluft hingegen zeigte nur *S. pneumoniae* einen positiven Phänotyp.



Als Standardbedingungen wurden daher für alle weiteren Experimente eine Temperatur von 35°C und erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration im Kerzentopf verwendet.

**Tabelle 22.** Bacteriocinproduktion unter unterschiedlichen Assay-Bedingungen (Inkubationstemperatur, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis) bei *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* TIGR4, *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 sowie *S. pneumoniae* 653. Eine Bacteriocinproduktion wurde mit einem Plus-Zeichen (+) angegeben. Eine besonders klare Hemmung wurde mit (++) bewertet und wurden keine Hemmhöfe entdeckt, also keine Bacteriocinproduktion festgestellt, wurde dies durch ein Minus-Zeichen (-) gekennzeichnet.

Stamm	Bacteriocinproduktion in Abhängigkeit von Temperatur		CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> - Verhältnis		
	35°C	37°C	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	Umgebungsluft
<i>S. pneumoniae</i> R6	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	+	-	-	+	-
<i>S. pneumoniae</i> 2306	++	+	-	++	-
<i>S. pneumoniae</i> 653	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 632	++	-	-	++	-

Durch den entwickelten Assay konnte eine Produktion von wachstumshemmenden Substanzen nicht nur in dem vollständig sequenzierten Stamm *S. pneumoniae* TIGR4, sondern auch in verschiedenen Stämmen anderer Serotypen nachgewiesen werden. Obwohl in allen Stämmen mit *pnc*-spezifischen Primern ein PCR-Produkt erhalten wurde, wiesen nicht alle einen positiven Phänotyp auf. Ob es sich bei den ausgeschiedenen Substanzen um Bacteriocine handelte, ist nur durch den Aufbau des spezifischen Assays vermutbar.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp von den verwendeten Inkubationsbedingungen (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis, Temperatur) abhängig ist. Ob es nun die produzierten Bacteriocine neben den verwendeten Indikatorstämmen auch weitere Bakterien hemmen, sollte in dem folgenden Versuch überprüft werden.

### 3.2 Wirkspektren der produzierten Bacteriocine

Durch die Etablierung des Assays konnte nun auch untersucht werden, ob die von *S. pneumoniae* produzierten Bacteriocine auf andere Bakterienarten wirken. Es wurden 15 pathogene Bakterienstämme (14 Gram-positive / 1 Gram-negativ) aus der Stammsammlung der Abteilung Mikrobiologie der TU Kaiserslautern als Indikatorstämmen betrachtet, als Produzenten wurden *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632, *S. pneumoniae* TIGR4, *S. pneumoniae* 628 und *S. pneumoniae* R6 verwendet.

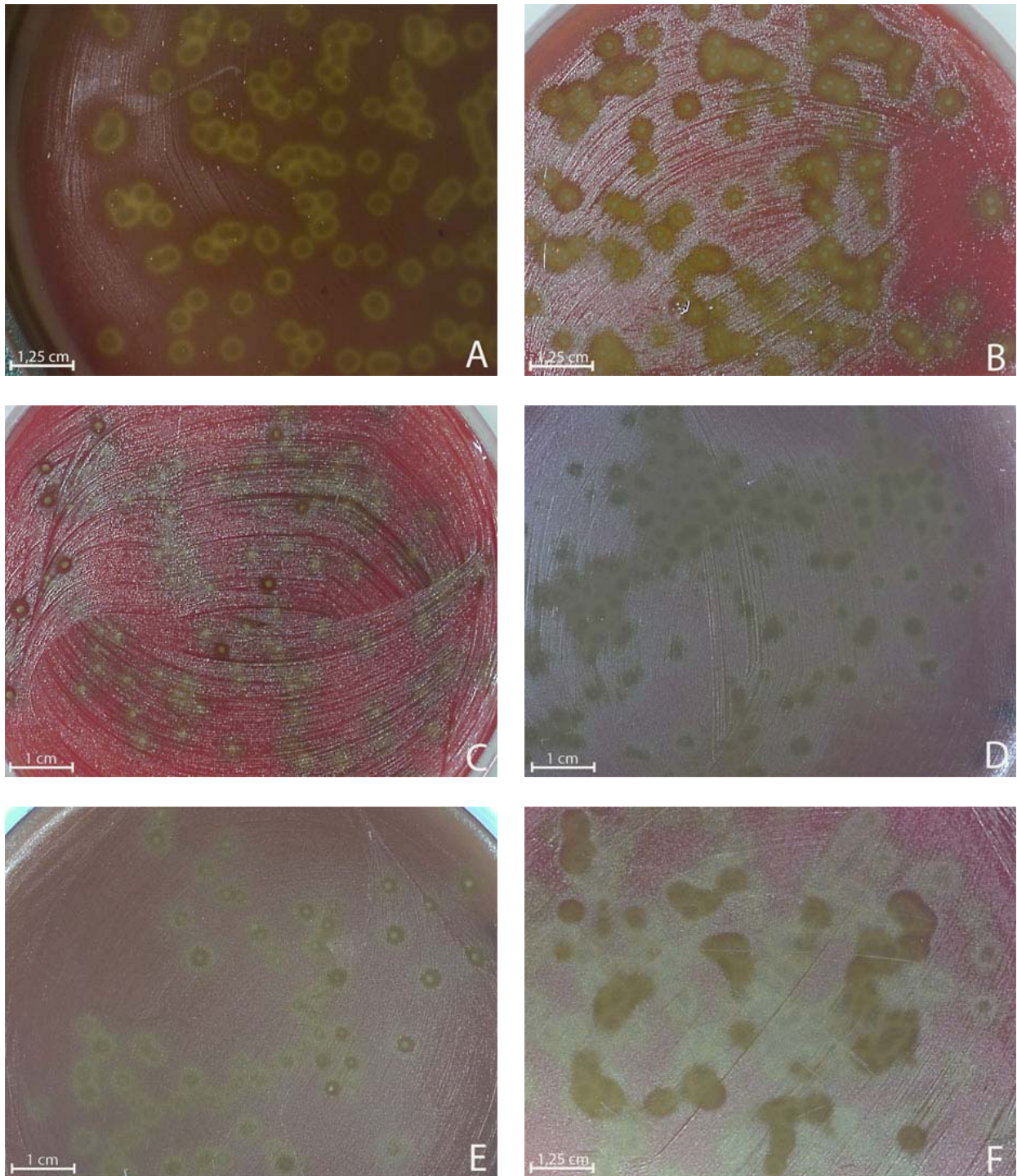
**Tabelle 23.** Wirkspektrum der von verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen produzierten Bacteriocine. Eine Bacteriocinproduktion wurde mit einem Plus-Zeichen (+) angegeben. Eine besonders klare Hemmung wurde mit (++) bewertet und wurden keine Hemmhöfe entdeckt, also keine Bacteriocinproduktion festgestellt, wurde dies durch ein Minus-Zeichen (-) gekennzeichnet.

Indikatorstamm	<i>S. pneumoniae</i>				
	2306	632	TIGR4	628	R6
<i>Micrococcus luteus</i> DSM2786	++	++	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	++	++	+	+	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 2306	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus oralis</i> 510	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> 15	-	+	-	-	-
<i>Streptococcus mitis</i> NCTC10712	+	+	-	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> 674	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus sanguis</i> DSM 20567	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 113	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	-	-	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> DB43	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> DSM50996	-	-	-	-	-

Bei Verwendung von Gram-positiven Bakterien als Indikator zeigte sich neben der Hemmung von *M. luteus* auch eine Hemmung auf Mitglieder der Familie der Streptokokken, aber abhängig vom Produzentenstamm wurden unterschiedliche Wirkungsspektren beobachtet. So wurde *S. mitis* NCTC10712 nur von 2306 und 632 gehemmt, *S. salivarius* 674 nur von 2306, und *S. oralis* 510, sowie *S. pyogenes* 15 nur von 632. Die am nächsten verwandten Bakterien, beide Mitglieder der Spezies der Pneumokokken, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* 2306 wurden hingegen nur von 632 gehemmt.

Somit besitzt *S. pneumoniae* 632 das breiteste Wirkspektrum (7 Stämme) aller untersuchten Stämme. Die beiden Stämme TIGR4 und 628 hemmten keinen der verwendeten Streptokokken Stämme.

Das Gram-negative Bakterium *Pseudomonas putida* DSM50996 wurde nicht im Wachstum gehemmt.



**Abbildung 18.** Wirkspektrum der Streptokokken-Bacteriocine. Als Produzenten wurden *S. pneumoniae* 632 (A-D) und *S. pneumoniae* 2306 (E,F) verwendet. Indikatorstämme: *S. pneumoniae* R6 (A), *S. oralis* (B), *S. pyogenes* (C) und *S. mitis* (D); von *S. mitis* (E), *S. salivarius* (F).

Die Experimente zeigten eine Affinität der vermutlichen Bacteriocinen zu nahe verwandten Streptokokken auf.

Eine Sequenzierung ausgewählter *S. pneumoniae* Stämme sollte nun zeigen, dass es sich bei dem amplifizierten PCR-Produkt tatsächlich um das *pnc*-Cluster handelt. Des Weiteren

ermöglicht die Sequenzierung der *pnc*-Cluster und zusätzlich der *spi*-Cluster die Konstruktion von Mutanten, welche für eine weitere Charakterisierung notwendig sind.

### 3.3 Analyse der sequenzierten Genomabschnitte

#### 3.3.1 Übersicht über die Bacteriocin-Cluster

Für eine detaillierte Untersuchung der unterschiedlichen Bacteriocinproduktion wurden die *pnc*-Cluster folgender Stämme vollständig sequenziert: *S. pneumoniae* Hu15 (19A), *S. pneumoniae* 632 (23F) und *S. pneumoniae* F4 (23F). Zusätzlich wurde von den Stämmen *S. pneumoniae* 628 (9V) und *S. pneumoniae* 2306 (23F) sowohl das *pnc*, wie auch das *spi*-Cluster sequenziert. So sollte untersucht werden, ob Unterschiede auf Ebene der Nukleotidsequenz die beobachtete Heterogenität der Bacteriocinproduktion hervorrufen. Des Weiteren konnten durch Kenntnis der Nukleotidsequenzen Mutanten in Genen ausgewählter Stämme konstruiert werden.

In Abbildung 19 sind die identifizierten und annotierten ORFs aller sequenzierten DNA-Abschnitte der Streptokokken-Stämme *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* Hu15, *S. pneumoniae* F4, *S. pneumoniae* 632, *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 628 und *S. pneumoniae* TIGR4 schematisch dargestellt.

Als Referenzen zur Analyse der Cluster wurden die Sequenzen der Stämme *S. pneumoniae* R6 oder *S. pneumoniae* TIGR4 benutzt (Hoskins *et al.*, 2001; Tettelin *et al.*, 2001), d.h. alle ORFs wurden anhand ihrer Homologien zu *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 annotiert. Zur Annotierung wurde auf die Bezeichnungen *spi* und *pnc* zurückgegriffen, um konsistent mit der bereits existierenden Annotierung (Reichmann & Hakenbeck, 2000) zu bleiben. Neue Gene wurden alphabetisch aufsteigend neu benannt.

Im Anhang B2.1 bis B2.7 sind die Eigenschaften der ORFs und der möglichen Genprodukte in den Genclustern aller sequenzierten Stämme zusammengestellt. Putative Gene, deren funktionelle Zuordnung nur aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu anderen Genen erfolgte, sind mit aufgeführt. Die Nukleotidsequenzen der sequenzierten DNA-Abschnitte wurden unter folgenden Nummern in die Genbank Datenbank übermittelt: *S. pneumoniae* 2306 EF488100, *S. pneumoniae* 2306*pncE* EF488094, *S. pneumoniae* 628 EF488095, *S. pneumoniae* 632 EF488096, *S. pneumoniae* F4 EF488097, *S. pneumoniae* Hu15 EF488098, *S. pneumoniae* R6 EF488099 und *S. pneumoniae* TIGR4 EF488093.

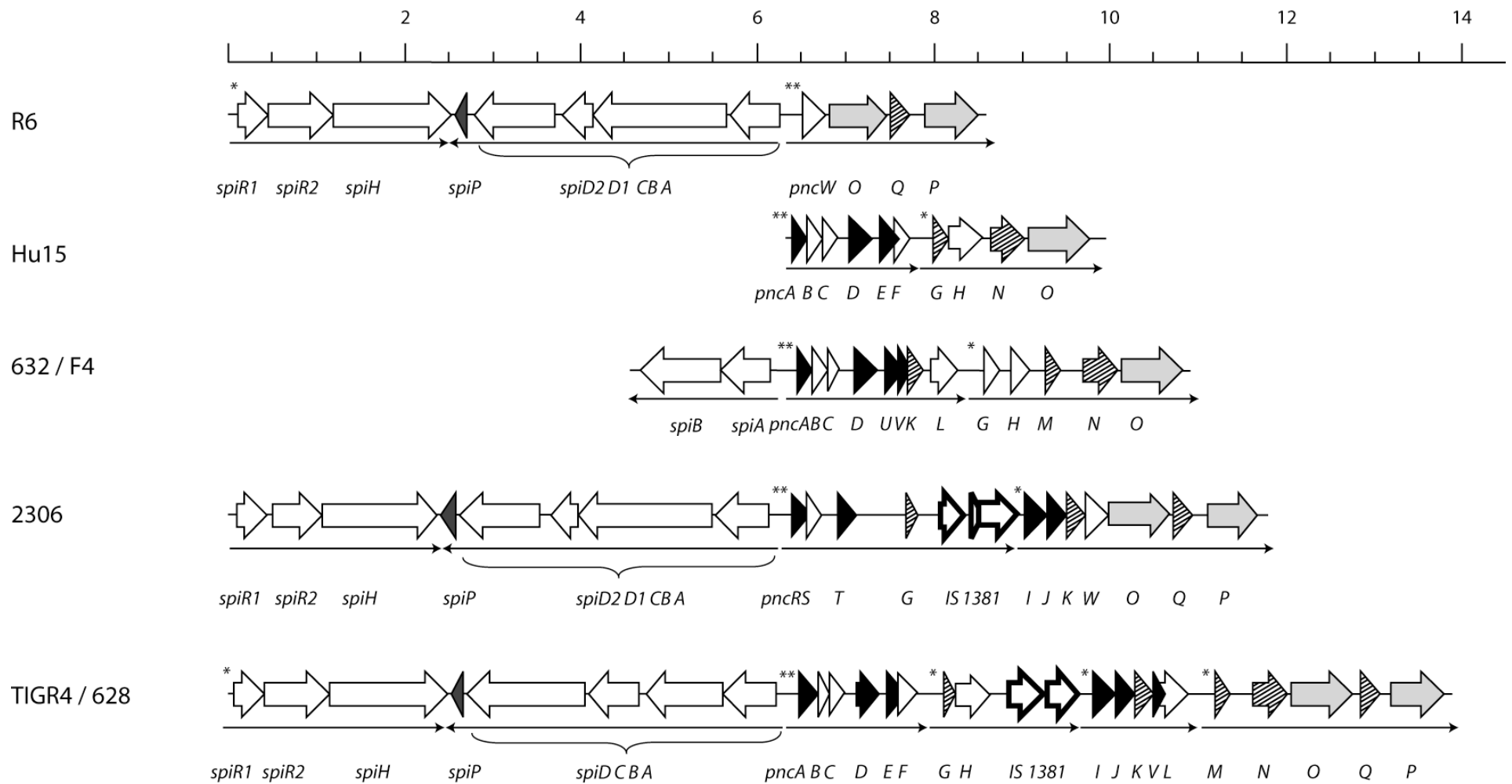
Proteine können aus verschiedenen Domänen bestehen, welche bestimmten Funktionen zugeordnet werden können (Bateman *et al.*, 2000). Viele dieser Domänen sind konserviert, das heißt sie kommen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Bakterien mehr oder weniger ähnlich vor. Zwei-Domänenpeptide sind z.B. die Histidinkinase SpiH mit einer Sensor- und einer Kinasedomäne oder die Bacteriocine. Daher wurde im Folgenden bei Bacteriocinen auch zwischen Leaderpeptid und prozessiertem, sekretiertem Produkt unterschieden.

### **3.3.2 Analyse des *spi*- und *pnc*-Clusters von *S. pneumoniae* 628**

Die Sequenzierung ergab eine Größe von 13966 bp für den Stamm *S. pneumoniae* 628, welcher zum Serotyp 9V gehört. Die Anordnung der ORFs war in diesem Fall identisch mit der des Bacteriocin-Clusters des Stammes *S. pneumoniae* TIGR4, welcher zum Serotyp 4 gehört. Eine Analyse mit dem Programm multalin (Corpet, 1988) zeigte eine Ähnlichkeit von 99 % zwischen *S. pneumoniae* TIGR4 und 628 auf Nukleotidebene (siehe Abbildung A1). Es wurden 47 Nukleotid- und 15 Aminosäurenaustausche im Vergleich zur Sequenz von TIGR4 gefunden. Davon traten die meisten in den Genen *pncF* und *pncO* auf (siehe Abb. 29 und 30).

### **3.3.3 Analyse von *S. pneumoniae* 632 und *S. pneumoniae* F4**

Beide Stämme, die demselben 23F Klon angehören, besitzen ein nahezu identisches Bacteriocincluster (99 %, 5 Nukleotidaustausche) (siehe Anhang A2).



**Abbildung 19.** Schematische Darstellung der ORFs folgender Streptokokken-Stämme: *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* Hu15, *S. pneumoniae* F4, *S. pneumoniae* 632, *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 628 und *S. pneumoniae* TIGR4. Die Gene des *pnc*-Clusters sind nur mit Großbuchstaben gekennzeichnet, mit Ausnahme des ersten *pnc*-Genes. Das für das Pheromon SpiP codierende Gen *spiP* ist dunkelgrau. Bacteriocingene mit typischer GG-Spaltstelle sind schwarz. Gene des IS1381-Elementes und verkürzte Derivate sind dick umrandet. Weiß sind hypothetische Gene mit unbekannter Funktion. Hellgrau sind Gene für CAAX-Peptidasen. Gene für Immunitätsproteine sind schraffiert eingezeichnet. Mit \* sind SpiR2-Erkennungsmotive markiert. Dünne Pfeile zeigen Transkriptionseinheiten.

### 3.3.4 Analyse des *spi*-Clusters von *S. pneumoniae* 2306

Das *spi*-Cluster des Stammes *S. pneumoniae* 2306 wurde detailliert analysiert, da dieser Stamm für weitere funktionelle Analysen selektiert wurde. Er zeigte eine starke Bacteriocinproduktion mit relativ breitem Wirkungsspektrum, und er war durch die Ausbildung einer kompetenten Phase gut transformierbar und somit genetischen Manipulationen gut zugänglich.

Auf dem 12018 bp langen Bacteriocin-Cluster wurden 22 ORFs bestimmt. Die Proteinsequenzen der gefunden ORFs zeigten eindeutige Homologien auf, um sie entsprechend der *S. pneumoniae* R6 Annotierung zu bestimmen. Es ließen sich dem *spi*-Cluster acht, dem *pnc*-Cluster elf und drei ORFs dem IS-Element IS1381 zuordnen. Die Sequenzen der einzelnen Genprodukte des *spi*-Clusters von *S. pneumoniae* 2306 wiesen eine höhere Ähnlichkeit zu den Genprodukten des R6 *spi*-Clusters auf, weniger zu denen von *S. pneumoniae* TIGR4. Dies zeigte sich auch in der Organisation der ORFs, die für den SpiABCD-Transporter codieren.

In der Literatur wurden Sequenzen möglicher Bindestellen des SpiR Responseregulators beschrieben (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000). Diese fanden sich in der Sequenz von *S. pneumoniae* 2306 an den gleichen Stellen wieder. Zum einen fand man die postulierte Consensus-Sequenzen ATTCARGANRT-TTYRATGMCH-ATTHWRATY-(N)<sub>19</sub>-DVTGHHYAWAMT (de Saizieu) und TTAGTTATCA-(N)<sub>13</sub>-TTTTTTATCA und TTAGTATATCA-(N)<sub>13</sub>-TTTTTCATCCA (Reichmann) stromaufwärts der Gene *spiR1* und *spiA*, wodurch sich zwei entgegen gesetzte Transkriptionseinheiten ergeben (siehe Abb. 19). In den folgenden Abschnitten wird noch einmal auf Unterschiede in den Genprodukten eingegangen.

#### **SpiR1 und Responseregulator SpiR2**

Die Proteinsequenz von SpiR1(2306) war im Vergleich zu den Sequenzen von R6 und TIGR4 um fünf AS verkürzt und besaß zusätzlich noch zwei Abweichungen zur Sequenz von SpiR1(R6) und vier zu SpiR1(TIGR4/628) (siehe Abbildung 20).

Das Responseregulator Protein SpiR2(2306) war bis auf drei AS-Austausche identisch zu dem entsprechenden Protein in R6. Im Vergleich mit SpiR2(TIGR4) fanden sich noch zwei weitere Austausche (siehe Abb. 21). Die DNA Bindungsdomäne von SpiR2 war nahezu identisch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in 2306 dieselben Regulationssequenzen wie in R6 beschrieben erkannt werden.



## SpiR1

	1						70
R6	MKHMIIQTQK	TVYKVNIDDI	YIIQTHPTKA	HTVQIVTEKA	SFNMLQNLSN	LENQYGETLM	RCHRNCLVNL
TIGR4/628	-- <b>Y</b> -----	-----	-----	----- <b>E</b> -----	-----	----- <b>C</b> -----	-----
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	71						112
R6	DKVKSIDFQE	RILFLGEEGQ	YAVKYARRRY	REIRQKWLKE	GE		
TIGR4/628	-- <b>L</b> -----	-----	-----	-----	---	---	---
2306	----- <b>K</b> -----	----- <b>K</b> -----	-----	-----	... ..		

**Abbildung 20.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiR1 aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienen die Sequenzen von SpiR1 aus *S. pneumoniae* R6. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-), nicht vorkommende durch einen Punkt (.) und abweichende fett gekennzeichnet.

## SpiR2

	1						70
R6	MRIFVLEDDF	SQQTRIETTI	EKLLKEHHIT	LSSFVFGKGP	DQLLAEVHEK	GAHQLFFLDI	EIRNEEMKGL
2306	-----	-----	----- <b>A</b> -----	<b>I</b> P-----	-----	-----	-----
TIGR4/628	-----	-----	----- <b>A</b> -----	<b>I</b> P-----	-----	-----	-----
	71						140
R6	EVARKIREQD	PYALIVFVTT	HSEFMPLSFR	YQVSALDYID	KALSAEEFES	RIETALLYAN	SQDSKSLAED
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628	----- <b>DR</b> -----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	141						210
R6	CFYFKSKFAQ	FQYPFKEVYY	LETSPRPHRV	ILYTKTDRLE	FTASLEEVFK	QEPRLQCHR	SFLINPANVV
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628	-----	-----	----- <b>A</b> -----	-----	-----	-----	-----
	211						245
R6	HLDKKEKLLF	FPNGGSCLIA	RYKVREVSEA	INNLH			
2306	-----	-----	-----	---	---	---	---
TIGR4/628	-----	-----	-----	----- <b>K</b> -----	---	---	---

**Abbildung 21.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiR2 aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienen die Sequenzen von SpiR2 aus *S. pneumoniae* R6. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-) und abweichende fett gekennzeichnet.

## Histidinkinase SpiH

Die Proteinsequenz der Histidinkinase SpiH von *S. pneumoniae* TIGR/628 besaß erhebliche Abweichungen (84 % Identität) zu den Aminosäure-Sequenzen von SpiH(2306) und SpiH(R6). Die beiden letztgenannten waren zueinander zu 100 % identisch (siehe Abb. 22). In dem Alignment (Abb. 22) sind zusätzlich noch die sieben vorhergesagten Transmembranhelices (+) und der konservierte Histidinrest (\*) an Position 254 eingezeichnet, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Reichmann & Hakenbeck, 2000).

Auffallend war hier die Konzentration von variablen Aminosäuren zwischen TIGR4/628 und R6/2306. Dies ist analog zu ComD, welches wie im Falle der verschiedenen CSP-Allele auf unterschiedliche SpiP-Peptide hinweist (Iannelli *et al.*, 2005; Pozzi *et al.*, 1996).

## SpiH

	1	++++++	++++++	++	++++	++++++	++++++	++++++
R6	MNIAWILLYA	LVINGLEIVI	FFKVDGIGLT	FDRIFKAFLL	KFLL-IIFTT	FQFLAVSKYL	SYFIEPLFGI	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----T	--T-----	-----D--	-E-----	-I---FV-VM	ISYIVGNV--	-----Y--	
		++++++	+ ++++++	++++++	+++	++	++++++	++++++
R6	GLSFLLLRGL	PKKILIFYGL	FPMILVELFY	RGVSYFVLPF	LGQGIVDGDG	NPIFLLIMIF	VCFIVLVFLK	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----	--L-F--	-----N--	-----	---Q-YDGY	SFTG-C-I--	NF--S-A--	
	141		++++++	++++++	+++	++++	++++++	
R6	WLDYDFTRLR	REFLDTGFQK	SLTKINWAMG	AYYLVMSLS	YLEYEQGIQS	TTVRHLILVF	YLLFFMGGIK	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----S--	K-I--KA--	---Q---I--	G-----E--	FE---S--	K-----	-----V--	
	211				*		280	
R6	KLDTYLKEKL	QEELNQEQL	RYRDMERYSR	HIEELYKEIR	SFRHDYTNLL	TSLRLGIEEE	DMEQIKEIYD	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----	Y-R-E--A-	-----	-----V-	-----	-----	-----V--	
	281						350	
R6	SVLRDSSQKL	QDNKYDLGRL	VNIRDRAKLS	LLAGKFIKAR	EKNIVFNVEV	PEEIQVEGMS	LLDFLTIVSI	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	---K-----	-N-----	---K-----	-----L--	D-----	-----	-----	
	351						420	
R6	LCDNAIEASA	EASQPHVSIA	FLKNGAQETF	IIENSIKEEG	IDISEIFSFG	ASSKGEERGV	GLYTVMKIVE	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----V	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	421		446					
R6	SHPNTNLNTT	CQNQVFRQVL	TVIHAE					
2306	-----	-----	-----					
TIGR4/628	-----S-----	-----	---T-					

**Abbildung 22.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiH aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienten die Sequenzen von SpiH aus *S. pneumoniae* R6. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-) und abweichende fett gekennzeichnet. Verhergesagte Transmembranhelices sind mit (+) und der konservierte Histidin-Rest mit (\*) markiert.

## Pheromon SpiP

Für die Durchführung noch folgender Versuche bedarf es einer genaueren Betrachtung des Peptides SpiP, welches in vorausgegangenen Experimenten seine Rolle bei der Induktion der Expression von Genen des *spi*- und des *pnc*-Clusters (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000) gezeigt hat. Die AS des Pheromons von 2306 stimmten zu 100 % mit dem des Stammes *S. pneumoniae* R6 überein, während es sich zu *S. pneumoniae* TIGR4 deutlich unterschied (Abb. 34). Das legte die Vermutung nahe, dass sich die Genexpression des *spi*- und/oder *pnc*-Cluster des Stammes 2306 durch Zugabe synthetisch hergestelltem SpiP-Peptid des R6-Typen stimulieren lässt.

Die Sequenz aller drei Leaderpeptide war vollständig konserviert. Es unterscheidet sich nur die Aminosäure-Sequenz des prozessierten Peptids. Dieser Aufbau war vergleichbar mit einem Bacteriocin der Klasse IIb. Der isoelektrische Punkt (pI) lag für SpiP(R6/2306) bei 5,13 und bei SpiP(TIGR4/628) bei 4,90. Für das prozessierte, also das an der GG-Spaltstelle

gespaltene Peptid lag dieser Wert bei 5,32 (TIGR4/628) bzw. 5,57 (R6/2306) (siehe Tabelle 32). Das bedeutet, dass sich der pI durch die Prozessierung kaum verändert.

### SpiP

	1				51
R6	MDKKQNLTSF	QELTTTELNQ	ITGGGWHEEL	LHETILSKFK	ITKALELPIQ L
2306	-----	-----	GG-----	-----	-----
TIGR4/628	-----	-----	GG-L----	-YNINRYAHY	--

**Abbildung 23.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiP aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienten die Sequenzen von SpiP aus *S. pneumoniae* R6. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-) und abweichende fett gekennzeichnet. Die GG-Spaltstelle ist fett und grau unterlegt.

### ABC-Transporter SpiABCD

Hier war die hohe Ähnlichkeit der ORF-Organisation zwischen *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* 2306 gut zu erkennen. So ist in 2306 und R6 eine Unterteilung des Gens *spiD* in *spiD2* und *spiD1* festzustellen, welches in *S. pneumoniae* TIGR4 von einem einzelnen ORF gebildet wird (siehe Abb. 26). Umgekehrt sind die Gene *spiB* und *spiC*, welche in *S. pneumoniae* TIGR4 einzeln vorliegen, in 2306 und R6 in einem einzigen ORF (*spiBC*) zusammen geschlossen (siehe Abb. 25). Auf der Sequenzebene zeigte sich dies durch ein STOP-Codon an Position 297 zwischen SpiBC(TIGR/628) und SpiD1/SpiD2(R6/2306) und an Position 120 zwischen SpiD1/SpiD2(R6/2306).

Das Protein SpiA zeigte sich in allen drei Stämmen konserviert. Es kam nur zu einem AS-Austausch in SpiA von TIGR4/628 im Vergleich zu SpiA(2306/R6) (siehe Abb. 24).

### SpiA

	1	#	#					70
R6	MTSYK	RTFVP	QIDARDCGVA	ALASIAKFYG	SDFSLAHLRE	LAKTNKEGTT	ALGIVKAADE	MGFETRPVQA
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	71		#		#			140
R6	YKTLFDMSDV	PYPFIVHVNK	EGKLQHYVV	YQTKKDYLII	GDPDPSVKIT	KMSKERFFYE	WTGVAIFLAT	
2306	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	D-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	141						195	
R6SpiA	KPS	YQPHKDK	KNGLLSKLPS	SDFQTKISHC	LHCSLKLIGH	YYQYRWFLLS	PRNLG	
2306SpiA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4/628	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

**Abbildung 24.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiA aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienten die Sequenzen von SpiA aus *S. pneumoniae* R6. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-) und abweichende fett gekennzeichnet. Die Peptidasedomäne ist schwarz unterlegt, Teile des aktiven Zentrums sind mit (#) markiert.

## SpiBC

	1						70
R6SpiBC	MKSTLGIISV	GLVITYILQQ	VMSFSRDYLL	TVLSQRLSID	VILSYIRHIF	ELPMSFFATR	RTGEIISRFT
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	71						140
R6SpiBC	DANSIIDALA	STILSLFLDV	SILILVGGVL	LAQNPNLFL	SLLSIPIYMF	IIFSFMKPF	KMNHDMVQSN
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	.....	.....	.....	-----	-----	-----	-----
	141						210
R6SpiBC	SMVSSAIED	INGIETIKSL	TSEENRYQNI	DSEFVDYLEK	SFKLSKYSIL	QTSLKQGTKL	VLNILILWFG
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	211						280
R6SpiBC	AQLVMSSKIS	IGQLITFNTL	FSYFTTPMEN	IINLQTKLQS	AKVANNRLNE	VYLVESEFQV	QENPVHSHFL
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	281	*			# # ###		350
R6SpiBC	MGDIEFDDL	YKYGFGRDTL	TDINLTIKQG	DKVSLVGVSG	SGKTTLAKMI	VNFPKPYKGH	ISINHQDIKN
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	.....	.....	.....	.....	-----	-----	-----
	351	#					420
R6SpiBC	IDKKVLRRI	NYLPQQAYIF	NGSILENLTL	GGNHMISQED	ILKAYELAEI	RQDIERMMPMG	YQTQLSDGAG
2306SpiBC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiB	.....	.....	.....	.....	-----	-----	-----
TIGR4/628SpiC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	491						517
R6SpiBC	DQGKIIEVGS	HQELMQAQQF	YHHLFNK				
2306SpiBC	-----	-----	-----				
TIGR4/628SpiB	.....	.....	.....				
TIGR4/628SpiC	-----	-----	-----				

**Abbildung 25.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiBC aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienten die Sequenzen von SpiBC aus *S. pneumoniae* R6. Die beiden Proteine SpiB und SpiC von *S. pneumoniae* TIGR4/628 sind schwarz, das Fusionsprotein SpiBC von 2306/R6 grau unterlegt. Ein Stern (\*) markiert die Stelle des STOP-Codons in TIGR4/628. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-), nicht vorkommende durch einen Punkt (.) und abweichende fett gekennzeichnet. Schwarz unterlegt ist die Transmembrandomäne, grau die ATP-Bindedomäne des Transporters. Die ATP binding site ist mit (#), das ATP Transporter Signature Motif mit (+) markiert.

## SpiD

	1						70
R6SpiD2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
R6SpiD1	MNPNFLRSVE	FYQRRYHNYA	TVLIIPLSLL	FTFILIFSLV	ATKEITVTSQ	GEIAPTSVIA	SIQSTSDNPI
2306SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	71				*		140
R6SpiD2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
R6SpiD1	LANHLVANQV	VEKGDLLIKY	SETMEESQKT	ALETQLQRFE	K.....	.....	.....
2306SpiD1	-----	-----	-----	-----	-OKEGLGILK	OSLEKATDLF	SGEDEFQYHN
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----	-----	-OKEGLGILK	OSLEKATDLF	SGEDEFQYHN

	141						210
R6SpiD2	..MNFTKQSH	DIELGITKTN	TEVSNQANLA	NSSSSAIEQE	ITKVQQQIGE	YQELRDAIIN	NRARLPTSNP
2306SpiD2	..-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R6SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TIGR4/628SpiD	TF-----	-----	-----s	-----	-----	-----	-----g
	211						280
R6SpiD2	HQSILNRYLV	ASQGQTQGTA	EEPFLSQINQ	SIAGLESSIA	SLKIQQAGIG	SVATYDNSLA	AKIEVLRTQF
2306SpiD2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R6SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	281						350
R6SpiD2	LQTASQQQLT	VENQLTELKV	QLDQATQRLE	NNTLTAPSKG	IVHLNSEFEG	KNRIPTGTEI	AQIFPIITDT
2306SpiD2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R6SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----s	-----	-----	-----	-----
	351						420
R6SpiD2	REVLITYYVA	SDYLPPLDKG	QTVRLKLEKI	GNHGITIIGQ	LQTIDQTPTR	TEQGNLFKLT	ALAKLSNEDS
2306SpiD2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R6SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2306SpiD1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	421			453			
R6SpiD2	KLIQYGLQGR	VTSVTAKKTY	FDYFKDKILT	HSD			
2306SpiD2	-----	-----	-----	---			
R6SpiD1	.....	.....	.....	...			
2306SpiD1	.....	.....	.....	...			
TIGR4/628SpiD	-----	-----	-----	---			

**Abbildung 26.** Alignment der Aminosäuren der Proteine SpiD aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628. Als Referenz dienten die Sequenzen von SpiD1 bzw. SpiD2 aus *S. pneumoniae* R6. Das Protein SpiD von *S. pneumoniae* TIGR4/628 sind schwarz, die beiden Proteine SpiD1 und SpiD2 von 2306/R6 grau unterlegt. Ein Stern (\*) markiert die Stelle des STOP-Codons in 2306/TIGR4. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-), nicht vorkommende durch einen Punkt (.) und abweichende fett gekennzeichnet.

### 3.3.5 Bacteriocingene

Charakteristisch für Bacteriocine sind die GG-Spaltstellen und die konservierten Leaderpeptide (Havarstein *et al.*, 1994). Die eigentlichen Bacteriocinpeptide wiesen untereinander nur wenige Gemeinsamkeiten auf. PncU und PncE teilten die größten Gemeinsamkeiten sowohl in ihrem Leaderpeptid, wie auch in der Aminosäuresequenz des Propeptides. Die Leaderpeptide der Bacteriocine PncR, PncA, PncD, PncV, PncU und PncE wiesen eine hohe Ähnlichkeit untereinander auf und besaßen eine konstante Länge von 21 AS. Die Leaderpeptide der Bacteriocine PncI, PncJ und PncT zeigten nur bedingt Ähnlichkeiten mit den oben genannten Leadersequenzen. Sie unterschieden sich ebenfalls in ihrer Länge (PncI 21 AS, PncJ 16 AS und PncT 18 AS).

Die Länge der Propeptide, der aktiven Form, variierte ebenfalls. Die kürzeste AS-Sequenz besaß PncV mit 27 AS, die Längste fand sich bei PncD (67 AS).

Von allen untersuchten Peptiden ließ nur bei PncJ zwei Transmembranhelices (THMs) vorhersagen. Auch die berechneten isoelektrischen Punkte waren bei allen, bis auf PncJ (5,89), in einem ähnlichen Bereich zwischen 4,25 und 4,86.

Verglich man die isoelektrischen Punkte nach erfolgter Prozessierung an der GG-Spaltstelle zeigte sich folgendes: Bei den Bacteriocinen PncA, PncE, PncU, PncJ und PncI(2306) änderte sich der pI von einem sauren in einen leicht basischen Bereich. Weniger ausgeprägt war dies bei PncI(TIGR4/628) und PncT. Kaum veränderte sich der isoelektrische Punkt der Bacteriocine PncV, PncR und PncD durch die Abspaltung des Leader-Peptides. Ob dies ein funktioneller Zusammenhang darstellt, ist nicht bekannt.

**Tabelle 24.** Isoelektrische Punkte (pI) von unprozessierten und prozessierten Bacteriocinen und Peptidpheromonen.

<b>Bacteriocin / Peptidpheromon</b>	<b>Prepeptid (Unprozessiert)</b>	<b>Propeptid (Prozessiert)</b>
SpiP(R6/2306)	5,13	5,57
SpiP(TIGR4/628)	4,90	5,32
PncR	4,47	4,66
PncT	4,29	6,01
PncI (2306)	4,64	8,03
PncI(TIGR4/628)	4,43	6,05
PncJ	5,89	8,83
PncE	4,86	8,86
PncD	4,58	5,21
PncV(632)	4,23	4,42
PncU	4,86	8,59
PncA	4,25	8,07

Die Bacteriocine des *pnc*-Clusters ließen sich anhand der in 1.4 beschriebenen Merkmale zur Klasse IIb zählen, da sie keine Lanthionine besitzen und nicht aktiv gegen *Listeria* sind (siehe 3.2). Zusätzlich sprach die Anordnung von zwei Bacteriocinen gefolgt von einem Immunitätsprotein, z.B. in *S. pneumoniae* 2306, TIGR4 und 628 mit PncI, PncJ und PncK, für eine Zuteilung zu dieser Gruppe (Moll *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1998; Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

Anhand der Anzahl der im Propeptid vorkommenden Cystein-Reste ließ sich eine Abschätzung des Wirkungsbereiches machen. Von (Jack *et al.*, 1995) wurde beschrieben, dass das Wirkspektrum umso breiter ist, je mehr Cystein-Reste vorhanden sind. Die innerhalb des *pnc*-Clusters vorkommenden Bacteriocine besaßen im Schnitt zwei Cysteine. Ausnahmen bildeten PncT mit drei und PncV bzw. PncD mit je einem Cystein-Rest.

Wie bereits bei der Analyse des *spi*-Clusters konnten auch innerhalb des *pnc*-Clusters die beschriebenen möglichen SpiR-Bindestellen identifiziert werden. Eine befand sich in allen Stämmen stromaufwärts von *pncA*. Eine weitere befand sich in allen Stämmen außer 2306 und R6 vor *pncG*. *S. pneumoniae* TIGR4/628 und 2306 besaßen noch ein vor *pncI* und nur in TIGR4/628 befindet sich von eine Bindestelle vor *pncM*. Dadurch ließen sich in TIGR4/628 vier, in R6 eine und in allen übrigen (632/F4, Hu15 und 2306) zwei Transkriptionseinheiten definieren (siehe Abb. 19).

Pnc			
<b>R</b>	2306	1	MNTKMMSQFS VMDNEMLDRI EGGIFGVDDA LFWA.GLGYV AGSIVDTAID DFTNQCRKNP HQWFQVRV 77
<b>A</b>	632/F4/628/TIGR4/Hu15	1	MNTKMMEQFS VMDNEELEIV EGGGRGNLGA IGGCIGAVLL AAATGPITGG AATLICVGS G IMSSL 65
<b>D</b>	632/F4/628/TIGR4/Hu15	1	MNTKMLSQLE VMDTEMLAKV EGGYSSTDCQ NALITGVTTG IITGGTGAGL ATLGVAGLAG AFVGAHIGAI GGGLTCLGGM VGDKLGLSW 89
<b>V</b>	632/F4 TIGR4/628	1	MNTKMMSQFS VMDNEMLACV EGGDIDWGRK ISCAAGVAYG AIDGCATTV 50 -D-----A-----GG-----
<b>U</b>	632/F4	1	MDTKMMSQFS VMDTEMLACV EGGGCNWGDF AKAGVGGA AV VAALGCAAGG VKYGKILGPW GAAIGGIGGA VVCGYLAYTA TS 82
<b>E</b>	TIGR4/628/Hu15	1	MDTKMMSQFS VMDTEMLACV EGGGCNWGDF AKAGVGGA RGLQLGIKTG TWQGAATGAA GGAILGGVAY AATCWW 76
<b>I</b>	2306 TIGR4/628	1	MDTKIMEQFH EMDITMLSSI EGGKNNWQTN VLEGGGA AFG GWGLGTAI CA ASGVGAPFMG ACGYIGAKFG VALWAGVTGA TGGF 84 -----GG-----D-----
<b>J</b>	2306/TIGR4/628	1	MNTYC NINETMLSEV YGGNSGGA AV VAALGCAAGG VKYGRLLGPW GAAIGGIGGA VVCGYLAYTA TS 67
<b>T</b>	2306	1	MEKIDYI TLNEVELETI SGGDDCFIGD IGCIGWLLK SIGGMIKPAP YVPPVCIPKS SWNPAPPVPC 67

**Abbildung 27.** Alignment der Aminosäuren der Bacteriocine des *pnc*-Clusters aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 bzw. F4, *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628 und *S. pneumoniae* Hu15. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-), nicht vorkommende durch einen Punkt (.) und abweichende fett gekennzeichnet. Die GG-Spaltstelle ist fett und grau unterlegt, Cystein-Reste im Propeptid sind weiß und schwarz unterlegt gedruckt.



### 3.3.6 Immunitätsgene

Immunitätsproteine sind Proteine, welche Immunität gegenüber Bacteriocinen vermitteln (Abee, 1995; Nissen-Meyer *et al.*, 1993). Sie bilden mit dem zugehörigen Bacteriocin und anderen Genen Operons. Eine Gemeinsamkeit der Immunitätsproteine ist die Anzahl an THMs. Sie alle besitzen 2 theoretische Transmembranhelices, was sie als Membranproteine klassifiziert. Eine andere Gemeinsamkeit ist ihr konservierter C-Terminus, der eine Rolle bei der Erkennung des Bacteriocins spielt (Johnsen *et al.*, 2005).

Als Ergebnis der Analyse zeigte sich, dass PncG die größten Sequenzunterschiede (an 9 bis 10 Stellen Aminosäureaustausche) aufweist und PncM einen Austausch besaß. PncK, PncN und PncQ sind zu 100 % identisch in den untersuchten Stämmen.

<b>Pnc</b>											
<b>G</b>		1									53
	632	MKKKILIIIFV	LYLIMSIFLY	PLRESIWYNL	FYTIAYMIAV	MIYFSLIKKK	EKK				
	F4	-----I	-----	-----	-----	-----	---				
	2306	-----I	-----	-----Q	-----V	-----A-T	GA				
	TIGR4	-----	-----	-----A-Q	-----V	-----AIN	GE				
	Hu15	-----	-----	-----A-Q	-----V	-----AIN	GE				
	628	-----	-----	-----A-Q	-----V	-----AIN	GE				
<b>K</b>		1									50
	632/F4/2306/TIGR4/628	MKAIFFIILF	AFQTYLIYLS	ISISDKKQKT	IELTSLNCFV	ILFLIYDKLI					
		51									69
	632/F4/2306/TIGR4/628	FLFIAYVFLI	IFILNLFRN								
<b>M</b>		1									58
	632	MDKKKIVSTI	ICIVFLVSV	DNFFRDLTPLL	FILNIIGLSC	FSVLTYINIK	EILLNISK				
	F4	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	628	-----	-----	-----	-----	-----	-----				
	TIGR4	-----	-----	-----	-----	-----K	-----				
<b>N</b>		1									50
	632/F4/TIGR4/628/Hu15	MEVFNMKYRL	FFVIFLSSVL	DILLGTFLQI	SIVSIGWLVL	YSGLEAGVF					
		51									100
	632/F4/TIGR4/628/Hu15	LLANKGVAVK	IKEVDIRNRF	KFIFGKTLWF	QILLLIFLII	KLYLGDLARL					
<b>Q</b>		101									132
	632/F4/TIGR4/628/Hu15	ILFYGHIFIV	FNALMYLLSS	SQVSLKKNKL	SS						
<b>Q</b>		1									50
	R6/2306/TIGR4/628	MYKHLFFLDS	KTLDRTPYI	LVLASDTIAF	NVFLVTFVSA	VVFNFLNSML					
		51									77
	R6/2306/TIGR4/628	ALMAIFIGAG	YVVGFWLLIL	NENQRAN							

**Abbildung 28.** Alignment der Aminosäuren der Immunitätsproteine PncG, PncK, PncM, PncN und PncQ des *pnc*-Clusters aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 bzw. F4, *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628 und *S. pneumoniae* Hu15. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-) und abweichende fett gekennzeichnet.

### 3.3.7 CAAX-Proteasen

Neuere Untersuchungen zeigten die Bedeutung von CAAX-Proteasen während der Bacteriocinproduktion, sowie bei der Entwicklung von Immunitäten gegenüber Bacteriocinen auf (Pei & Grishin, 2001; Reinicke *et al.*, 2005; Trueblood *et al.*, 2000; Zhang & Casey, 1996). Das Vorhandensein solcher Proteasen in dem Bacteriocin-Cluster von *S. pneumoniae* ist deshalb sehr interessant.

#### Pnc

<b>O</b>		1							70
632		MKKYQLLFKI	SAVFSYLFFV	FGLSQMTLII	QNYWQFSSQI	GNFVWIQNFL	SLLFSGVMIW	ILVKTGHGYL	
F4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Hu15		-----	-----D-----	-----V-----	-----	-----	-----	-----	
R6		-----	-----	-----L--V-----	-----	-----I-----	-----	-----	
2306		-----	-----	-----L--V-----	-----	-----I-----	-----	-----	
628		-----	-----	-----S--L--V-----	-----	-----L--I-----	-----	-----G-----	
TIGR4		-----	-----	-----S--L--V-----	-----	-----L--I-----	-----	-----G-----	
		71							*+
632		FHIPRKKWLW	YSILTVLVV-	LQISFNVQTA	KHVQSTAEGW	AVLIGYSGTN	FAELGIYITL	FFLTPLMEEL	
F4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	V-----	
Hu15		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
R6		-R-----	-----	-H-----	-----	N-----	-----V--	-----	
2306		-R-----	-----	-H-----	-----	N-----	-----V--	-----	
628		-R-----	-----	-L- F-----	-----	-----	-----A-	---V-----	
TIGR4		-R-----	-----	-L- F-----	-----	-----	-----A-	---V-----	
		632	IYRGLLQHAF	FKHSRFGLDL	LLPSILFALP	HFSSLPSSLDD	IFIFATSGII	FASLTRYTKS	IYPSYAVHVI
F4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Hu15		-----	-----	-----	-----	-----W-----	-----	-----G-----	
R6		-----	-----	-----	-----L-----	-----V--F-----	-----	-----G-----	
2306		-----	-----	-----	-----L-----	-----V--F-----	-----	-----G-----	
TIGR4		-----	-----	-----	-----	-----V--V-----	-----	-----G-----	
628		-----	-----	-----	-----	-----A-----	-----	-----	
		211	229						
632		NNIFATLPFL	LTFLHRVLG						
F4		-----	-----						
Hu15		-----	-----						
R6		---V-----	-----						
2306		---V-----	-----						
TIGR4		---V-----	-----						
628		---V-----	-----						
<b>P</b>		1							70
R6		MEFFDKFHAL	CFGFLVLIIV	ITVPYTINHG	DFFQNESALI	IVSLLVTSLS	VAYARKFEMI	SFGMLSCKQL	
2306		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4		-----	-----	-----	G-----	L-----	-----	-----	
628		-----	-----	-----	G-----	L-----	-----	-----	
		71							*+ 140
R6		LLFIAIFLLS	VLETLVYIHF	FAVSSGSGVQ	HLAEVSRGIS	LSLILTTSVF	GPIQEELIFR	GLLQGAVFND	
2306		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TIGR4		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
628		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
		141	*						
R6		SWLGLVLTSS	LFSFMHGPSN	VPSFIFYLLG	GLLLGLAYKK	SQNLWVSTLV	HMFYNWPLL	YYL	
2306		-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	
TIGR4		-----	-----	-----	-----	-----	-----L-----	---	
628		-----	-----	-----	-----S-----	-----R-----	-----L-----	---	

**Abbildung 29.** Alignment der Aminosäuren der Proteine PncO und PncP des *pnc*-Clusters aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 bzw. F4, *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628 und *S. pneumoniae* Hu15. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-) und abweichende fett gekennzeichnet. Grau unterlegt sind konservierte Motive, ein Stern (\*) markiert putative zinkbindende, ein Plus (+) katalytisch wirksame Reste.

### 3.3.8 Hypothetische Proteine

Neben den Bacteriocinen, den Immunitätsproteinen und CAAX-Proteasen befanden sich im *pnc*-Cluster der untersuchten *S. pneumoniae*-Stämmen noch weitere mögliche Proteine, über deren genaue Funktion keine Aussage gemacht werden konnte. Dazu gehörten PncFWBLH und PncS. Anhand der Anzahl der Transmembranhelices konnte man für z.B. PncL oder PncH eine Einordnung als Membranproteine vornehmen.

Auffällig im Alignment von PncH war eine Verkürzung von 63 AS bei 632/F4 im Vergleich mit PncH(TIGR4/628/Hu15).

<b>Pnc</b>									
<b>F</b>		1							66
	TIGR4	MARCSNWCCG	WSYTWRCSLC	SNMLVVIMDF	KSFIIGLVVG	IFGPYMDCLI	RKIFSKSSKK	DTDSTL	
	Hu15	-----	-----	-----	-----	----- <b>N</b> -----	----- <b>FP</b> -----	----- <b>P</b> -----	
	628	-----	-----	-----	-----	----- <b>N</b> -----	----- <b>SP</b> -----	----- <b>P</b> -----	
<b>H</b>		1							70
	632	.....	.....	.....	.....	.....	.....	...MRLREFE	
	F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	TIGR4	MKTFLAKKRN	IFLARLFLGQ	LPLLVSITYLF	LSRQFLNFSV	VFQFLLVVIN	LASILVTVYL	TRE-- <b>I</b> ----	
	628	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- <b>I</b> -----	
	Hu15	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----- <b>I</b> -----	
		71							134
	632	DDDLVSPRTN	QLMFIGLTGF	MSIICLYRGI	TAGESYQQLI	AYIGAILCLI	IMLLLIWGLK	YYKK	
	F4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	TIGR4	-----	-----	-----	-----	----- <b>V</b> -----	----- <b>M</b> -----	-----	
	628	-----	-----	-----	-----	----- <b>V</b> -----	----- <b>M</b> -----	-----	
	Hu15	-----	----- <b>AD</b> -----	----- <b>FV</b> -----	----- <b>SETEF</b> -----	----- <b>F</b> -----	----- <b>T</b> -----	----- <b>M</b> -----	
<b>W</b>		1							70
	R6/2306	MNTKMMSQFS	VMDNEMLVRT	EDGDVSDIYR	GYANQRSPFA	SYPSILKNSG	PPFVSGYCLR	GYHGRGYIGA	
		71 77							
	R6/2306	GFHLCGI							

**Abbildung 30.** Alignment der Aminosäuren der Proteine PncF, PncH und PncW des *pnc*-Clusters aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 bzw. F4, *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628 und *S. pneumoniae* Hu15. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-) und abweichende fett gekennzeichnet.

<b>Pnc</b>									
<b>B</b>		1							53
	632	MILKYSIIIA	INLLSYLLTY	KISKLSKNHE	NKIVSKILII	LSIVYVIVDA	LLS		
	F4	-----	-----	-----	-----	-----	---		
	TIGR4	-----	-----	----- <b>D</b> -----	-----	-----	---		
	Hu15	-----	-----	----- <b>D</b> -----	-----	-----	---		
	628	-----	-----	----- <b>D</b> -----	-----	-----	---		
<b>C</b>		1							56
	632/F4/TIGR4/628/Hu15	MLYLVDGLVG	IKNLTINYLY	LIFFAFCKLI	NSIVKLFAR	RITKLRYFRY	SRLLS		
<b>S</b>		1							70
	2306	MLQVALLIQQ	LMILRINAGK	ILISGSVFVY	RYSSVVLYKN	LYNLMTYAVI	ETILLQTSRL	FCYKFTCS	
<b>L</b>		1							50
	632/F4/TIGR4/628	MKCLLALKVE	ILIGEEKLVV	QQGLHMAQLM	GVQQRFDISI	GTICYNRCN			
		51							100
	632/F4/TIGR4/628	WCCRWSYTW	CSLCSNMLV	IMDFKSFIIG	LVVGIFGPYM	DDLIRKIFSK			

632/F4/TIGR4/628	101	110
	SSKKD	TDSTL

**Abbildung 31.** Alignment der Aminosäuren der Proteine PncB, PncC, PncS und PncL des *pnc*-Clusters aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 632 bzw. F4, *S. pneumoniae* TIGR4 bzw. 628 und *S. pneumoniae* Hu15. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestich (-) und abweichende fett gekennzeichnet.

Mit Hilfe der Sequenzierung der PCR-Produkte wurde zweierlei erreicht. Zum ersten wurde bewiesen, dass es sich bei dem amplifzierten PCR-Produkten um die *pnc*-Cluster handelt und so alle Stämme die genetische Voraussetzung zur Produktion von Bacteriocinen besitzen. Zum zweiten wurde durch die zusätzliche Sequenzierung der *spi*-Cluster die Möglichkeit zur Herstellung von Mutanten in sowohl dem *pnc*- wie auch im *spi*-Cluster gegeben.

### 3.4 Konstruktion von Mutanten in *S. pneumoniae* 2306

Der Zusammenhang der Bacteriocinproduktion und dem TCS *spi* sollte durch Analyse des Verhaltens verschiedener Mutanten genauer untersucht werden. Dabei wurden zwei Arten von Mutanten hergestellt. Es wurde eine Deletionsmutante, der alle innerhalb des *pnc*-Cluster vorkommenden Bacteriocingene fehlen, sowie so genannte „Loss-of-function“-Mutanten durch Insertionsmutageneses in verschiedenen Genen des *spi*- und des *pnc*-Clusters hergestellt.

#### 3.4.1 Transformation der Plasmide in *S. pneumoniae* 2306

Die Gene *pncR-K* des Stammes *S. pneumoniae* 2306 sollten deletiert und durch das Spectinomycin-Resistenzgen *aad9* aus pDL278 (LeBlanc *et al.*, 1991) ersetzt werden. Dabei handelt es sich um alle putativen Bacteriocin- und Immunitätsproteine, sowie die Gene des IS-Elementes. Der Stamm wurde ausgewählt, da er erstens einen klar definierten Bacteriocinphänotyp besitzt und vor allem weil er transformierbar ist. Die Deletion sollte mit Hilfe eines Doppelcrossovers durchgeführt werden (siehe Abb. 8). Dazu wurden wie in 2.13.1 beschrieben vorgegangen.

Zur Untersuchung des Einflusses des Zwei-Komponenten-Systems *spi* an der Regulation der Bacteriocinproduktion wurden Mutanten in den Genen *spiB* und *spiR2* hergestellt. Diese sollten entweder funktionslose Varianten des ABC-Transporters besitzen (im Falle von *spiB*) oder des Responseregulators (im Falle von *spiR2*). Zusätzlich wurde noch das Gen *pncO*, welches für eine Protease der CAAX-Familie codiert, inaktiviert. Das Ausschalten der Gene erfolgte nach dem Prinzip der Insertionsduplikation (siehe 2.13.2).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt.

**Tabelle 26.** Ergebnisse der Transformation von *S. pneumoniae* 2306 mit den Plasmiden pJDR1, pJDB2, pJDO3 und pGEM-ASB-1. Angeben ist die Anzahl an erhaltenen Kolonien pro Blutagarplatte (CfU pro 150 µl). Es wurden zwei Ansätze (A1 und A2) durchgeführt.

Plasmid	N=30		N=45		N=60	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2
pJDR1	2	-	83	75	81	59
pJDB2	1	1	66	120	61	46
pJDO3	1	7	75	101	89	60
pGEM-ASB-1	160	160	180	200	11	20

Die Auszählung der Kontrollen bei Nephelo 45 (ohne Antibiotika) ergab  $29 \times 10^4$  CfU/ml.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz (siehe 2.11.3) wurde der Mittelwert beider Transformationsansätze (A1 und A2) errechnet. In Tabelle 27 sind die Werte aufgelistet.

**Tabelle 27.** Errechnete Transformationseffizienzen in Prozent für Transformationen mit dem Stamm *S. pneumoniae* 2306 mit den Plasmiden pJDR1, pJDB2, pJDO3 und pGEM-ASB-1.

Plasmid	N=30	N=45	N=60
pJDR1	$4,593 \times 10^{-3}$	0,182	0,161
pJDB2	$2,299 \times 10^{-3}$	0,213	0,123
pJDO3	0,018	0,404	0,171
pGEM-ASB-1	0,367	0,437	0,036

Die Transformationseffizienz des pGEM-ASB-1 lag durchweg höher als mit den pJDC9-Konstrukten. Des Weiteren war *S. pneumoniae* 2306 bei Nephelo 45, also in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase, im Vergleich mit N=30 und N=60 am Besten transformierbar.

Von jeder Platte der Ansätzen N=45 (A1, A2) und N=60 (A1, A2) wurden jeweils vier Transformanten gepickt und über eine PCR überprüft (siehe 2.11.3). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und so die Mutanten verifiziert. Von richtigen Transformanten wurden Glycerin-Kulturen hergestellt und deren Bacteriocinphänotyp mit Hilfe des Platten-Assays ermittelt.

Die generierten Transformanten konnten nun auf Unterschiede in ihrem Bacteriocinphänotyp getestet werden.

### 3.5 Bacteriocin-Platten-Assay der *S. pneumoniae* 2306 Transformanten

#### 3.5.1 *S. pneumoniae* 2306 Mutanten als Produzenten

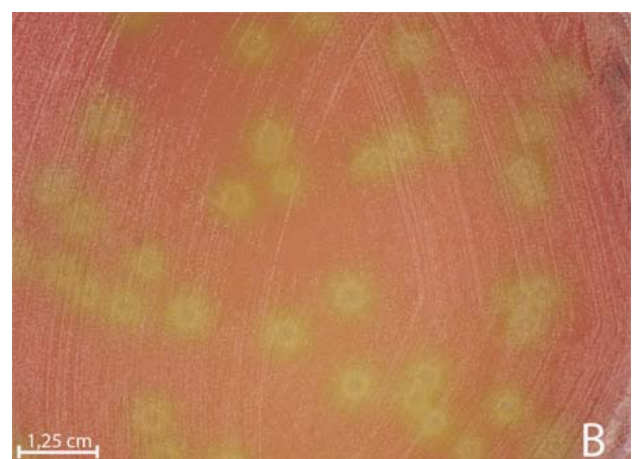
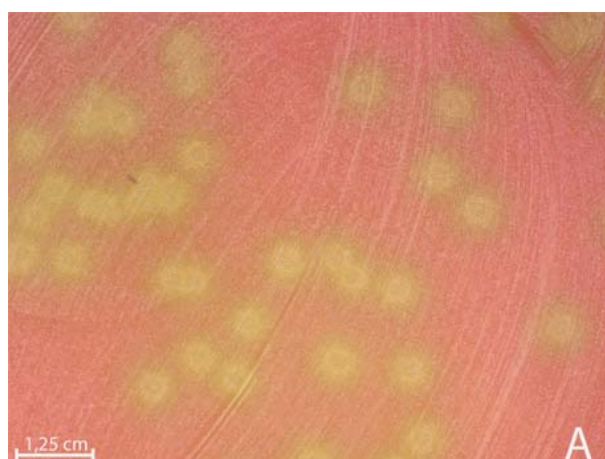
Die Auswirkungen der eingefügten Deletionen auf die Bacteriocinproduktion wurden im Platten-Assay analysiert. Wie zuvor wurden als Indikatorbakterien *L. lactis* und *M. luteus* verwendet. Als Kontrolle diente der Wildtyp von *S. pneumoniae* 2306 (Tabelle 28).

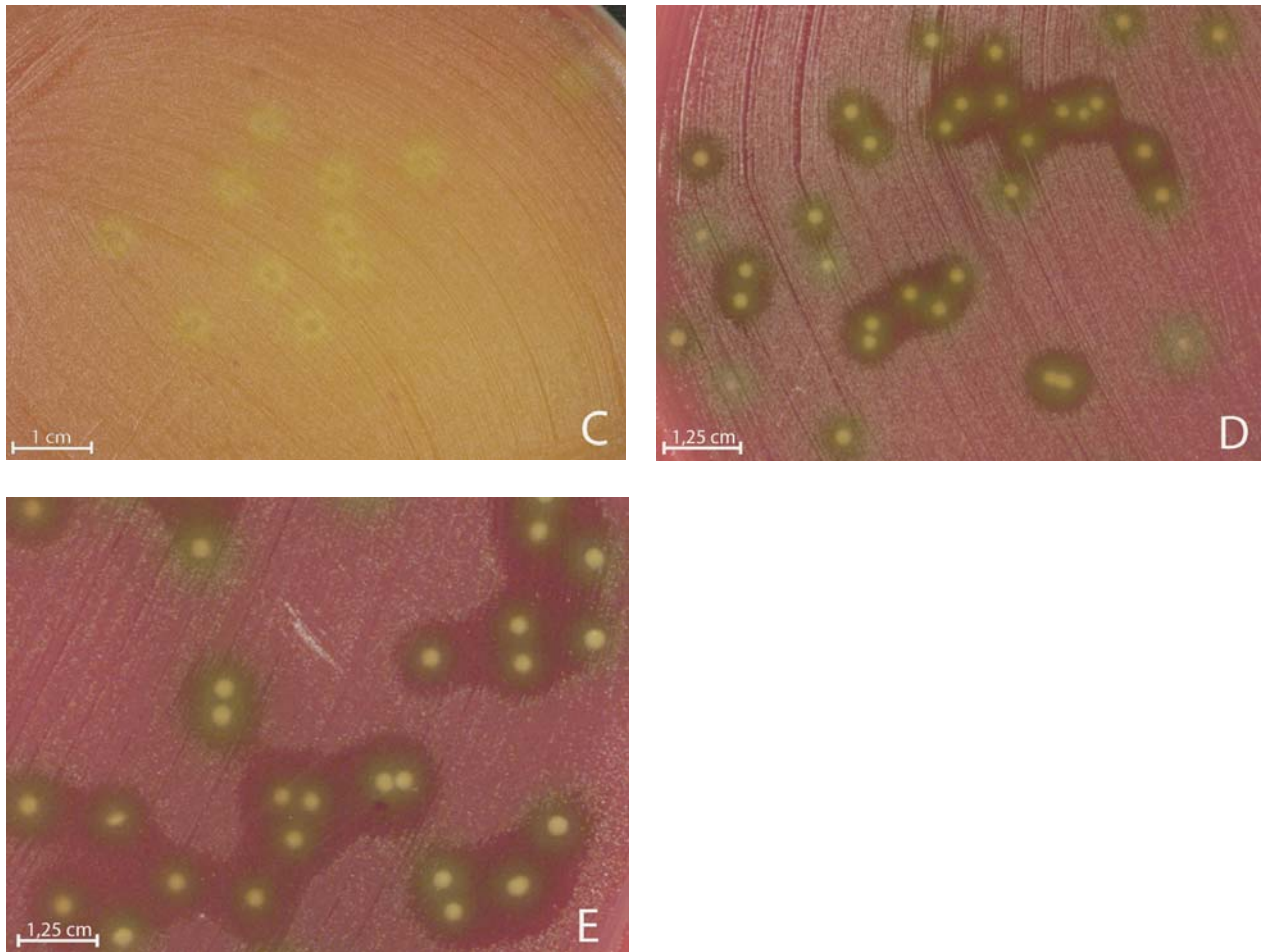
**Tabelle 28.** Bacteriocinproduktion der *S. pneumoniae* 2306 Mutanten gegen *L. lactis* bzw. *M. luteus*. Eine besonders klare Hemmung wurde mit (++) bewertet und wurden keine Hemmhöfe entdeckt, also keine Bacteriocinproduktion festgestellt, ist dies durch ein Minus-Zeichen (-) gekennzeichnet.

Bacteriocinproduzierender Stamm	Indikatorstamm	
	<i>L. lactis</i>	<i>M. luteus</i>
<i>S. pneumoniae</i> 2306 Wildtyp	++	++
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>spiR2</i> ::pJDC9	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>spiB</i> ::pJDC9	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 2306 <i>pncO</i> ::pJDC9	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 2306Δ <i>pncR-K</i>	+	+

Die Mutanten im *spi*-Cluster von *S. pneumoniae* 2306 zeigten im Gegensatz zum Wildtyp einen negativen Bacteriocinphänotyp. Das heißt es trat keine Wachstumshemmung der beiden Indikatorbakterien auf. Auch die Mutante in *pncO*, welches für eine CAAX-Protease codiert, zeigte keine Hemmwirkung auf *L. lactis* oder *M. luteus*.

Die Mutante *S. pneumoniae* 2306Δ*pncR-K*, in welcher die Bacteriocingene deletiert und durch die Spectinomycin-Kassette ersetzt wurden, zeigte eine Hemmwirkung auf beide Indikatorbakterien. Dieser positive Bacteriocinphänotyp war jedoch sowohl bei *L. lactis* wie auch bei *M. luteus* nicht so stark ausgeprägt, wie der Phänotyp des Wildtyps. Die Abbildungen 32A bis 32E zeigen die Ergebnisse des durchgeführten Assays. Man erkennt den negativen Phänotyp der *spiR2*-, *spiB*- und *pncO*-Mutanten, den reduzierten Phänotyp der Δ*pncR-K*-Mutante, sowie den positiven Phänotyp des Wildtyps. Dabei war die Wahl des Indikatorbakteriums nicht entscheidend für die Ausprägung der Hemmwirkung. Auf Grund der besseren Darstellbarkeit ist nur die Wirkung auf *L. lactis* gezeigt ist.





**Abbildung 32.** Bacteriocin-Assay mit Mutanten des Stammes *S. pneumoniae* 2306 gegen *L. lactis*: *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 (A), *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (B), *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 (C), *S. pneumoniae* 2306Δ*pncR-K* (D) und als Kontrolle *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp (E). Ein negativer Bacteriocinphänotyp ist bei A, B und C zusehen, ein positiver in D und E.

Die negativen Bacteriocinphänotypen der *spiR2*- und der *spiB*-Mutante zeigten, dass ein funktionsfähiges *spi*-Cluster für die Ausprägung der Hemmzonen in dem Platten-Assay notwendig ist, und dieser somit die Produktion von Bacteriocinen tatsächlich anzeigt. Wird der Transport des SpiP-Peptidpheromons aus der Zelle über SpiABCD unterbrochen (*spiB*-Mutante) findet keine Bacteriocinproduktion statt (siehe Abb. 32B). Dies gilt auch, wenn die Regulation durch den Responseregulator SpiR nicht mehr stattfinden kann (Abb. 32A).

Dass auch die von *pncO* codierte CAAX-Protease bei der Ausbildung eines positiven Bacteriocinphänotyps eine Rolle spielt zeigt die Abbildung 32C.

### 3.5.2 Wirkspektrum der *S. pneumoniae* 2306 Mutanten

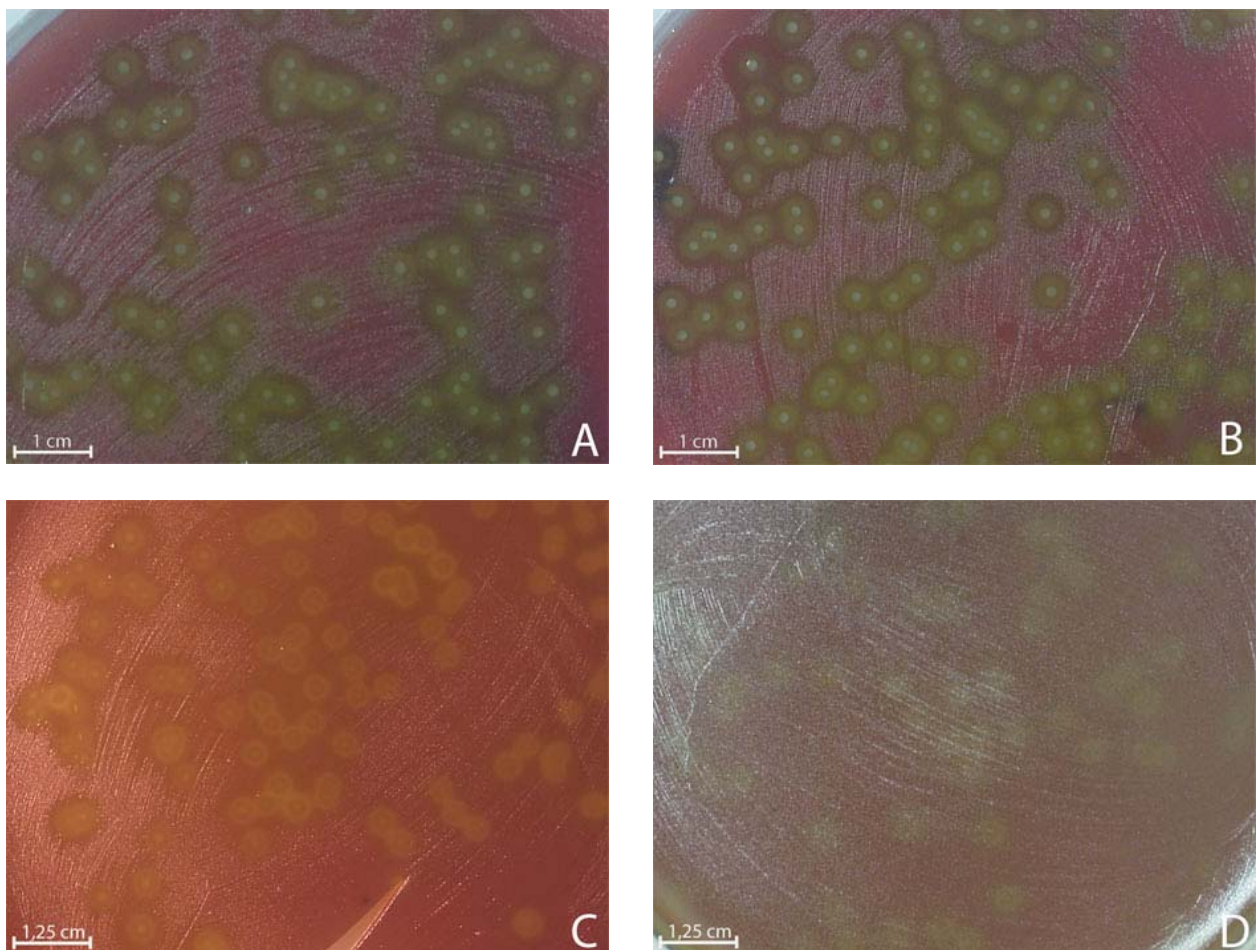
Neben *M. luteus* und *L. lactis* wurde der Bacteriocin Platten-Assay auch mit den im Abschnitt 3.2 erwähnten Bakterien als Indikatorbakterien und den *S. pneumoniae* 2306 Transformanten

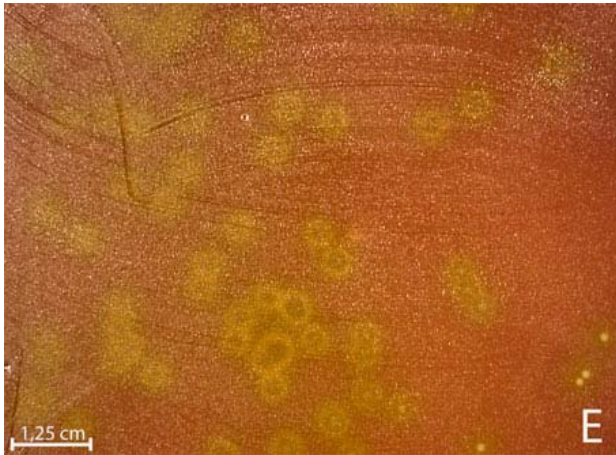


durchgeführt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede im Wirkspektrum zwischen den verschiedenen Mutanten. Die Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9, *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 zeigten einen negativen Phänotyp, d.h. es wurde keines der getesteten Indikatorbakterien gehemmt. Auch die Mutante *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K* zeigte dasselbe Wirkspektrum wie der 2306 Wildtyp. Eine Einteilung des erhaltenen Phänotyps in (++) oder (+), wie bei *M. luteus* oder *L. lactis*, konnte nicht vorgenommen werden.

### 3.5.3 *S. pneumoniae* 2306 Mutanten als Indikatorbakterien

Die Transformanten des Stammes 2306 wurden nicht nur als Bacteriocinproduzenten verwendet, sondern auch als Indikatorbakterien. Dadurch sollten mögliche Effekte der eingeführten Deletionen auf die Immunität gegen die vom Wildtyp produzierten Bacteriocine untersucht werden.





**Abbildung 33.** Bacteriocin-Assay des Stammes *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp gegen dessen Mutanten: *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 (A), *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (B), *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 (C) und *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K* (D). Zusätzlich wurde noch *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp gegen sich selbst getestet und abgebildet (E). Ein positiver Bacteriocinphänotyp ist bei A, B und C zusehen, ein negativer in D und E.

Die Mutanten mit Deletionen in Genen des *spi*-Clusters zeigten eine Sensitivität gegenüber den Bacteriocinen des 2306 Wildtyps (Abbildung 33A, B), d.h. es ließen sich Hemmhöfe um die Kolonien des Bacteriocinproduzenten erkennen, wie sie auch bei sensitiven Bakterien wie *L. lactis* auftraten. Daraus ließ sich folgern, dass zur Immunität ein funktionelles *spi*-Cluster vorhanden sein muss und bestätigte damit die Aussage, dass sowohl Bacteriocine wie auch Immunitätsprotein innerhalb des *pnc*-Clusters vorkommen (de Saizieu *et al.*, 2000).

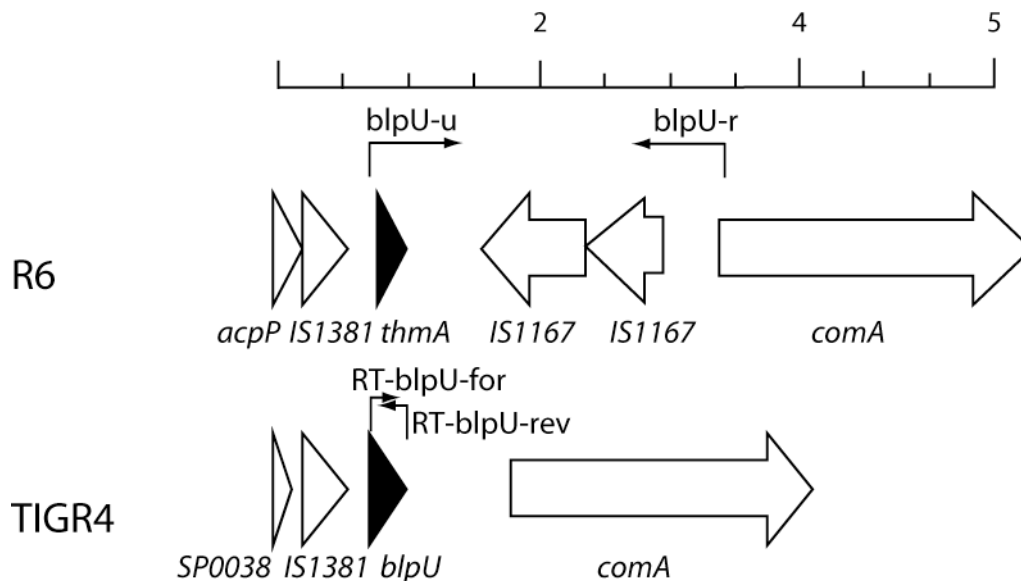
Der Wegfall der Immunität bei *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 (siehe Abb. 33C) war auch an den Hemmhöfen zu erkennen. Dieses gab einen Hinweis auf eine mögliche Rolle von PncO bei der Ausbildung von Immunität gegenüber eigenen Bacteriocinen. Unterstützt wurde diese Hypothese durch das Ergebnis des Versuches mit *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K*, welche keine Sensitivität gegenüber den Bacteriocinen zeigte (Abb. 33D). In dieser Mutante ist das Gen *pncO* intakt.

Als zusätzlichen Test wurde noch *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp gegen *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp getestet. Hier zeigte sich, dass der Wildtyp nicht in der Lage war sich selbst zu hemmen.

Die verschiedenen Transformanten wiesen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Dabei zeigten die *spi*-Mutanten einen zu erwartenden negativen Bacteriocinphänotyp. Ebenfalls keine Bacteriocinproduktion zeigte die PncO-Mutante. Einzig die *pnc*-Mutante zeigte einen unerwartenden Phänotyp, für dessen Erklärung weitere Experimente notwendig waren.

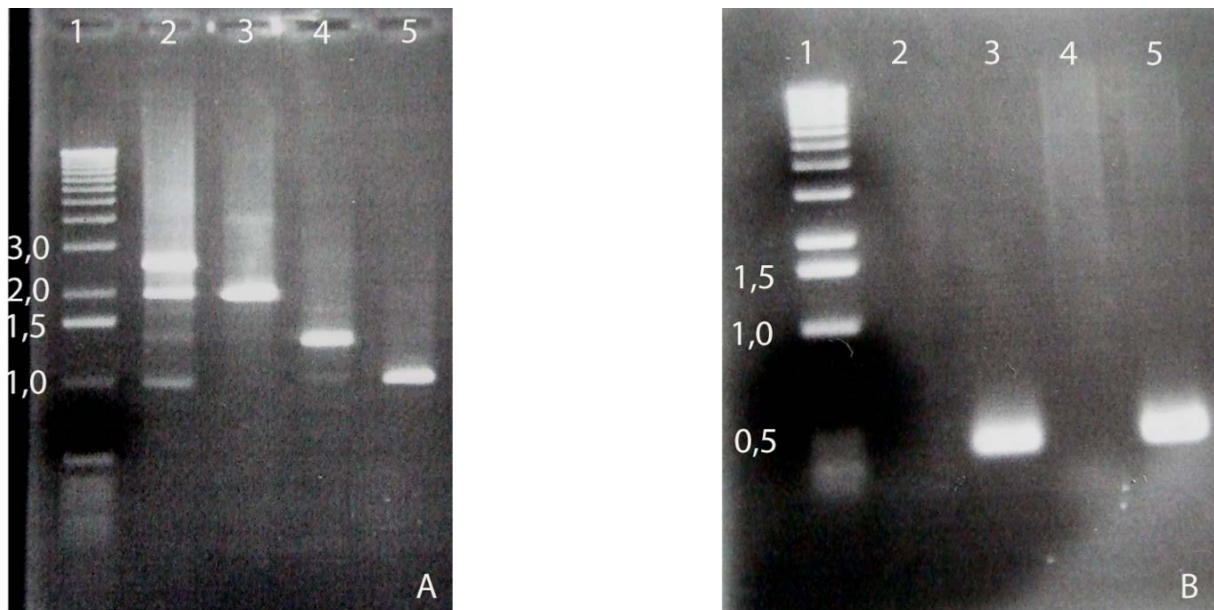
### 3.6 Identifizierung eines Bacteriocin-ähnlichen Gens in *S. pneumoniae* 2306 außerhalb des Bacteriocin-Clusters

Durch die Analyse der Genomsequenzen von *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* TIGR4 wurde eine weitere Nukleotidsequenz identifiziert, deren Genprodukt Merkmale von Bacteriocinen aufwies. Diese Sequenz fand sich in beiden Genomen stromaufwärts des *comAB*-Operons. Die Abbildung 34 zeigt einen Ausschnitt aus diesem Bereich.



**Abbildung 34.** Schematische Darstellung der Organisation der Region um das *com*-Operon von *S. pneumoniae* R6 und TIGR4. Neben den Genen sind auch die Positionen der zur Amplifikation des Bacteriocingens verwendeten Primer eingetragen.

Um zu überprüfen, ob sich dieses Gen auch in *S. pneumoniae* 2306 finden lässt, wurden Primer entworfen, die zu Beginn der Gene *comA* (*blpU-r*) und *thmA* bzw. *blpU* (*blpU-u*; R6 bzw. TIGR4) liegen. Des Weiteren wurden die Primer *RT-blpU-for* / *blpU-r* zur Amplifikation eingesetzt.



**Abbildung 35.** PCR-Produkte mit chromosomaler DNA von **A.** *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 mit den Primern thmA-u/blrU-r (2, 4) und RT-blrU-for/blrU-r (3, 5); Marker Invitrogen 1 kb DNA Ladder (1). **B.** *S. pneumoniae* 2306 und *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ pncR-K mit den Primern RT-blrU-for/blrU-r (2, 4) und blrU-u/RT-blrU-r (3,5). Marker Invitrogen 1 kb DNA Ladder (1).

Mit den ausgewählten Primern ließ sich sowohl in *S. pneumoniae* TIGR4 wie auch in R6 Produkte amplifizieren, die in ihrer Größe den mit Hilfe der Genomsequenzen errechneten entsprachen (siehe Abbildung 35, Tabelle 29) und die Position der mit dem Amplikon abgedeckten Gene im Genom bestätigte. Kein Produkt ließ sich hingegen mit chromosomaler DNA des Stamms *S. pneumoniae* 2306 mit den Primern RT-blrU-for/blrU-r amplifizieren. Im Gegensatz dazu erhielt man mit blrU-u und RT-blrU-r ein Produkt (Abb. 35B3), welches in seiner Größe dem theoretischen Produkt entsprach (ca. 300 bp). Dieses ließ darauf schließen, dass die genomische Organisation um das mögliche Bacteriocinogen im Stamm 2306 anders als in *S. pneumoniae* R6 oder TIGR4 ist. Gleiches gilt auch für die Mutante *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ pncR-K (siehe 3.4).

**Tabelle 29.** Verwendete Primer zur Amplifikation eines PCR-Produktes in der com-Region von *S. pneumoniae* 2306, R6 und TIGR4, sowie dessen Länge in bp.

Primer	Größe PCR-Produkt		
	<i>S. pneumoniae</i> R6	TIGR4	2306
thmA-u/blrU-r	2741 bp	1298 bp	-
RT-blrU-for/blrU-r	2514 bp	1071 bp	-
blrU-u/RT-blrU-r	-	-	283

Die DNA-Sequenz des PCR-Produktes wurde sequenziert. Auf der erhaltenen DNA-Sequenz wurden ein Gen identifiziert, das Homologie zu den Genen thmA von *S. pneumoniae* R6 und

*blpU*, sowie *pncE* von *S. pneumoniae* TIGR4 aufwies und als *pncE* bezeichnet wurde (Abbildung 36).

### PncE

	1								76
2306	MNTKTMSQFE	IMDTEMLACV	EGG	GCN	WGDF	AKAGVGGGAA	RGLQLGIKTR	TWQGAATGAV	GGAILGGVAY
TIGR4 B1pU	-----	-----	-GG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----
R6 ThmA	---K---	-----	-GG-	-----	-----	-V-----	-----	-----	-A-----
TIGR4 PncE	-D-M--S	V-----	-GG-	-----	-----	-----	-G-----	-----	-A-----
	71	76							
2306	AATCWW								
TIGR4 B1pU	-----								
R6 ThmA	-----								
TIGR4 PncE	-----								

**Abbildung 36.** Alignment der Aminosäuren der Proteine PncE aus *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* R6 (ThmA) und *S. pneumoniae* TIGR4 (BlpU bzw. PncE). Als Referenz dienten die Sequenzen von PncE aus *S. pneumoniae* 2306. Im Alignment selbst sind gleiche Aminosäuren durch einen Bindestrich (-) und abweichende fett gekennzeichnet. Die GG-Spaltstelle ist fett und grau unterlegt.

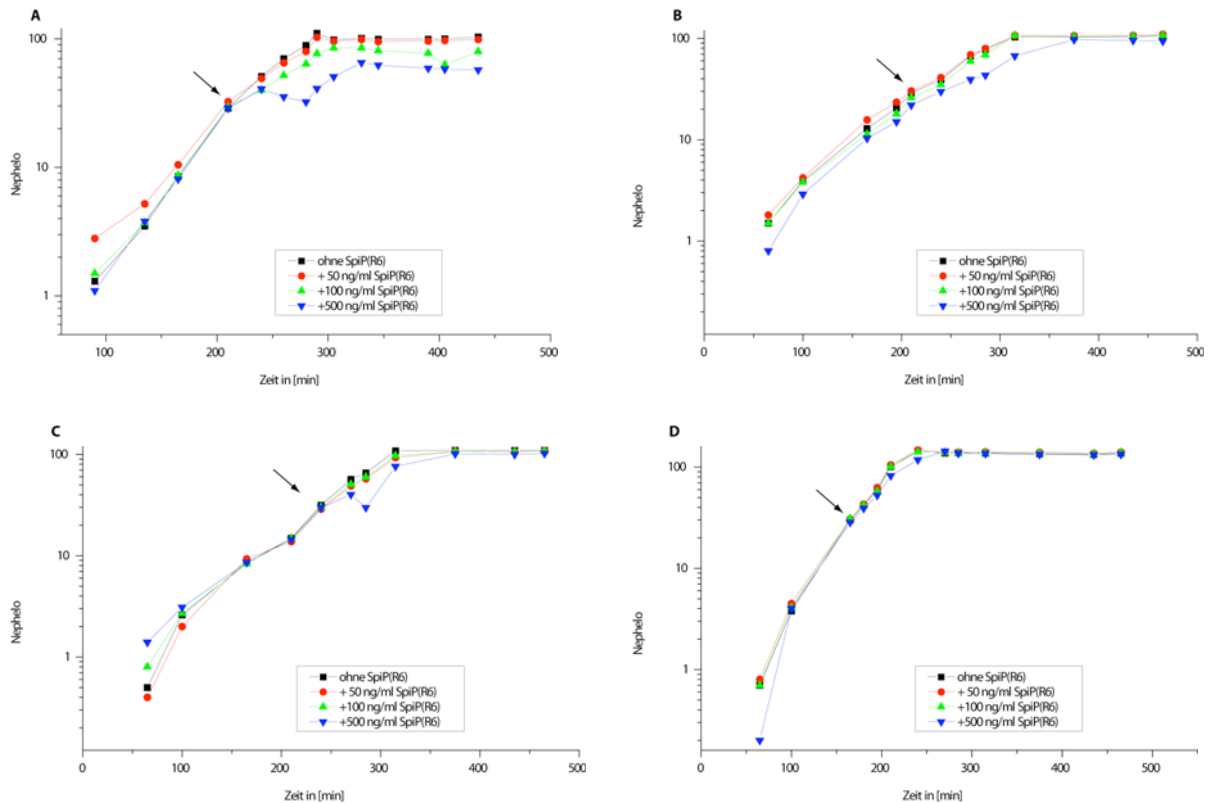
PncE wies eine Ähnlichkeit von 100 % zu dem Protein BlpU aus *S. pneumoniae* TIGR4 auf. Zu dem Gen ThmA besaß es nur eine Ähnlichkeit von 96 %. Es ließ sich jedoch keine Aussage über dessen Position im Genom von 2306 machen. Weitere Versuche flankierende Sequenzen zu amplifizieren schlugen fehl.

Ein Vorhandensein eines weiteren Bacteriocingene außerhalb des *pnc*-Clusters bot eine ausreichende Erklärung für den weiterhin positiven Phänotyp der *pnc*-Mutante. In weiteren Versuchen sollte nun die Expression der gefundenen Bacteriocingene untersucht werden. Dazu wurde zuerst eine für eine Induktion benötigte Konzentration des Peptidpheromon SpiP bestimmt.

### 3.7 Einfluss des Peptidpheromons SpiP auf das Wachstum

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration zur Induzierung der Bacteriocingenexpression wurde das Peptidpheromon SpiP(2306) in drei verschiedenen Konzentration dem Stamm *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp und dessen Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9, *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 und dem Wildtyp *S. pneumoniae* R6 zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (Nephelo-Wert 30 bis 35) zugegeben.





**Abbildung 37.** Wachstum der Stämme *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp (A), *S. pneumoniae* 2306spiR2::pJDC9 (B), *S. pneumoniae* 2306spiB::pJDC9 (C) und *S. pneumoniae* R6 (D) nach Zugabe von SpiP(2306). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe. Ohne Zugabe von SpiP(2306) (schwarze Quadrate) und mit Zugabe von 50 ng/ml (roter Punkt), 100 ng/ml (grünes Dreieck, Spitze oben) und 500 ng/ml (blaues Dreieck, Spitze unten) SpiP(2306).

Alle vier Stämme (*S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* 2306, *S. pneumoniae* 2306spiR2::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306spiB::pJDC9) wurden wie in Material und Methoden beschrieben in vier Ansätzen kultiviert und ihr Wachstum nephelometrisch gemessen. Bei Erreichen eines Nephelo-Werts von 30 wurde das synthetisch hergestellte SpiP(2306)-Peptid in den Konzentration 50 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml zugeben und das Wachstum weiterverfolgt.

Es ist in Abbildung 37 zu erkennen, dass die Zugabe von SpiP(2306) in einer Konzentration von 50 ng/ml keine Auswirkungen auf den Wachstumsverlauf aller untersuchten Stämme hat. Bei Zugabe von 100 ng/ml SpiP(2306) zeigte nur der 2306 Wildtyp einen etwas verlangsamten Wachstumsverlauf und erreichte bei einem niedrigeren Nephelo-Wert die stationäre Phase.

Eine deutliche Abweichung zum üblichen Wachstumsverlauf zeigte sich bei einer Konzentration von 500 ng/ml SpiP(2306) bei 2306 und *S. pneumoniae* 2306spiB::pJDC9 (Abbildung 37A, C): ca. 30 Minuten nach Zugabe, in denen die Stämme normales Wachstum zeigten, nahmen die Nephelo-Werte ab und fielen innerhalb weiterer 30 Minuten um acht

Nephelo-Einheiten auf N=32 (Wildtyp) bzw. um zehn Nephelo-Werte auf N=30 (*spiB*-Mutante). In der darauf folgenden Zeitspanne war kein Bakterienwachstum zu beobachten. Diese ist bei dem Wildtyp stärker ausgeprägt, als in der Mutante. Nach 80 Minuten (Wildtyp) bzw. 30 Minuten (*spiB*-Mutante) begannen die Stämme wieder zu wachsen. Jedoch erreichte die stationäre Phase des mit 500 ng/ml induzierten Wildtyps nicht den Nephelo-Wert des un- bzw. mit 50 oder 100 ng/ml induzierten Wildtyps. Die Nephelo-Werte der stationären Phasen der unterschiedlich induzierten SpiABCD-Transportermutante *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 entsprachen dem der uninduzierten Mutante. Das bedeutet, dass das Wachstum der Mutante durch Zugabe von SpiP nicht in dem Maße geschwächt wurde, wie es bei dem Wildtyp der Fall war.

*S. pneumoniae* R6 und die Responseregulator-Mutante *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 zeigten trotz Zugabe einen normalen Wachstumsverlauf.

Der Wildtyp und die verschiedenen Mutanten reagierten auf die Zugabe unterschiedlicher SpiP-Konzentrationen unterschiedlich. Eine hohe Konzentration führte zu einem abnormalen Wachstumsverlauf, weswegen zur Induktion der Bacteriocingenexpression für alle nachfolgenden Versuche eine SpiP(2306)-Konzentration von 100 ng/ml verwendet wurde.

### **3.8 Expressionsanalyse der Bacteriocingene durch RT-PCR**

Durch den Bacteriocin-Assay wurde die Produktion bzw. Nicht-Produktion von Bacteriocinen in dem Wildtyp von *S. pneumoniae* 2306 und den konstruierten Mutanten phänotypisch sichtbar gemacht. Für eine genauere Untersuchung des regulatorischen Zusammenhangs zwischen dem *spi*-Cluster und dem *pnc*-Cluster wurde mit Hilfe der RT-PCR (siehe 2.9.3) die Expression von mehreren Genen bestimmt. Es wurden Primer für die beiden Bacteriocingene innerhalb des *pnc*-Clusters *pncI* und *pncJ* sowie auch für *pncE* (außerhalb des *pnc*-Clusters) ausgewählt. Die Versuche wurden mit dem Stamm *S. pneumoniae* 2306, den *S. pneumoniae* 2306 Mutanten, *S. pneumoniae* TIGR4 und *S. pneumoniae* R6 durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils zu Beginn der stationären Wachstumsphase (N=90) abgeerntet und danach ihre RNA isoliert (siehe 2.9.4). In weiteren Experimenten wurde den wachsenden Kulturen (Nephelo N=30) das synthetisch hergestellte Pheromonpeptid SpiP(2306) in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben (siehe 3.8.2), um dessen Einfluss auf die Expression zu untersuchen. Die Expression der Lactatdehydrogenase (*ldh*) diente bei jedem Versuch als Kontrolle und Standard.

Die PCR-Produkte hatten eine Größe von: *ldh* (504 bp), *pncI* (517 bp), *pncJ* (319 bp) und *pncE* (184 bp). Gemessen wurde die Expression als so genannter Cp-Wert. Der Cp-Wert (Crossing-

Point) entspricht dabei dem Wert, bei dem die Fluoreszenz den Schwellenwert des LightCyclers überschreitet. Dabei gilt, je kleiner der Wert, desto schneller also der Schwellenwert erreicht ist, desto größer ist die Konzentration der mRNA des Genes, desto höher ist dessen Expression *in vivo*. Als Leer- bzw. Background-Kontrolle wurde eine Non-Template Control (NTC) benutzt. Das ist eine Probe, in der die cDNA durch Wasser ersetzt wurde. Dabei gilt, je größer dieser Wert ist, desto weniger Verunreinigungen enthalten die Proben.

Die Cp-Werte der Bacteriocingene *pncE*, *pncI* und *pncJ* wurden in Relation zur Expression der LDH in Abbildung 40 eingetragen. Dabei wurde der Cp-Wert der LDH auf 1 gesetzt und das Verhältnis der anderen Gene dazu berechnet. Die X-Achse schneidet die Y-Achse der Abbildung 40 auf dem Niveau der NTC-Expression der LDH.

In Anschluss an eine Messung der Expression folgte eine Bestimmung des Schmelzpunktes des amplifizierten PCR-Produktes. Dieser Schmelzpunkt ist für jedes PCR-Produkt spezifisch, so dass sich dadurch die PCR-Produkte sowohl untereinander, als auch von Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikationsprodukten unterscheiden lassen. Die jeweilige Höhe des Peaks spiegelt die Genauigkeit der Probenpräparation wider und wird in den nachstehenden Experimenten nicht weiter betrachtet.

### **3.8.1 Bacteriocingenexpression in nicht induzierten *S. pneumoniae* 2306 Zellen**

Die Expression des Bacteriocingens *pncE* (Abbildung 40) lag in allen Wildtyp-Stämmen unterhalb der Expression der LDH, während sie in allen Mutanten darüber stieg (max. 1,1 in *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9).

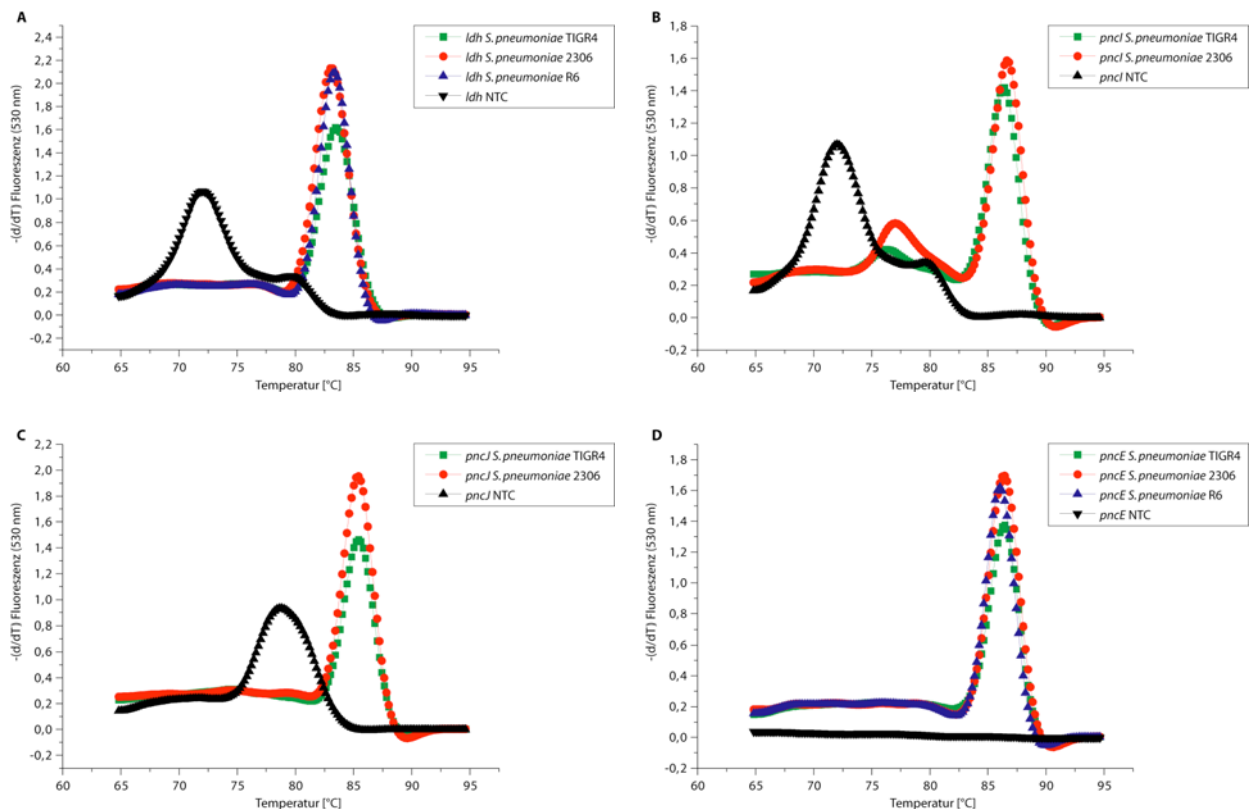
Die *pncI* Expression lag immer unterhalb von *pncJ* (Abb. 40). In den Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9, *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 befand sich die Expression der Gene *pncI* und *pncJ* auf dem Level der Mutante *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K*, in der die Gene deletiert wurden (Abbildung 40). Die gemessene Expression der Gene *pncI* und *pncJ* war also auf Verunreinigungen bzw. Primerdimere zurückzuführen. Nur in *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 war die Expression ähnlich im Vergleich zu der des *S. pneumoniae* 2306 Wildtyps (Abbildung 40).

Betrachtete man den Verlauf der Schmelzpunktanalysen, bestätigten sich diese die Expressionskurven. Bei den Wildtypen besaßen alle erhaltenen Amplifikationsprodukte einen definierten Schmelzpunkt (Abbildung 38A, B, C und D). Dieser war für alle untersuchten Gene eindeutig und wich von dem Schmelzpunkt der zugehörigen NTC ab. Im Falle der Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 zeigte

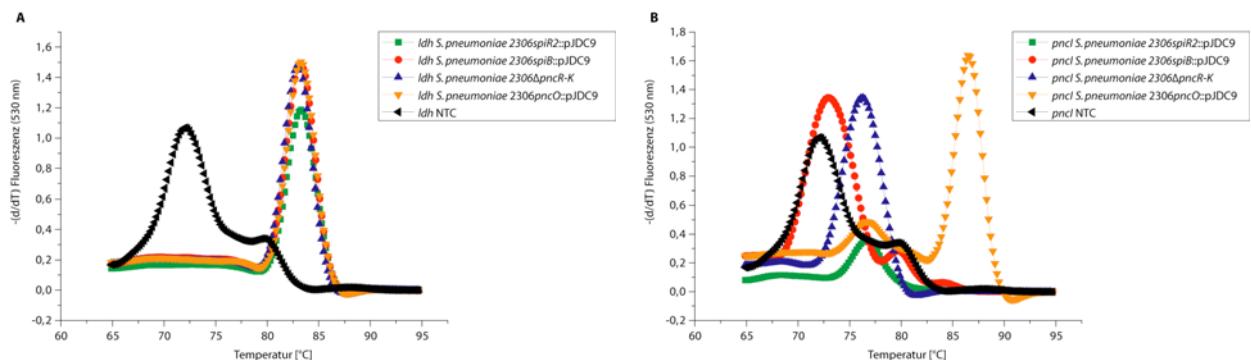


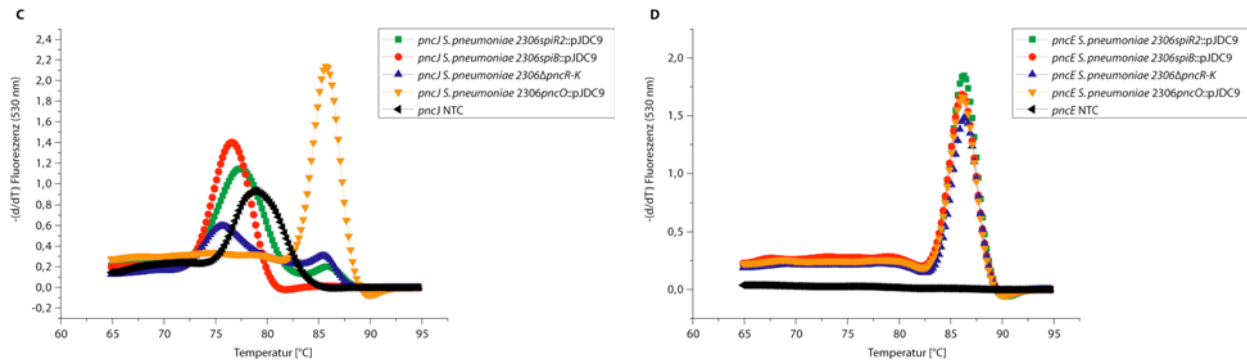
sich, dass mit den verwendeten Primern keine definierten Produkte amplifiziert wurden (Abbildung 39B, C). Da in der *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K* Mutante die Gene *pncI* und *pncJ* deletiert wurden, konnten für sie auch keine spezifischen Schmelzkurven ermittelt werden (Abb. 42B, C).

Die Schmelzkurve des Amplikons der Mutante *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 bestätigte, dass *pncI* und *pncJ* exprimiert wurden (Abbildung 39B, C), da der Schmelzpunkt des Amplikons mit dem Schmelzpunkt des Wildtyp-Amplikons (Abb. 38B, C) übereinstimmte.



**Abbildung 38.** Schmelzpunktanalyse in *S. pneumoniae* TIGR4 (grüne Quadrate), *S. pneumoniae* 2306 (rote Punkte) und *S. pneumoniae* R6 (blaue Dreiecke, Spitze oben). Angegeben ist die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegenüber der Temperatur folgender Gene: Lactatdehydrogenase (*ldh*) (A), *pncI* (B), *pncJ* (C) und *pncE* (D). Schwarze Dreiecke (Spitze unten) symbolisieren die Non-template Control (NTC).





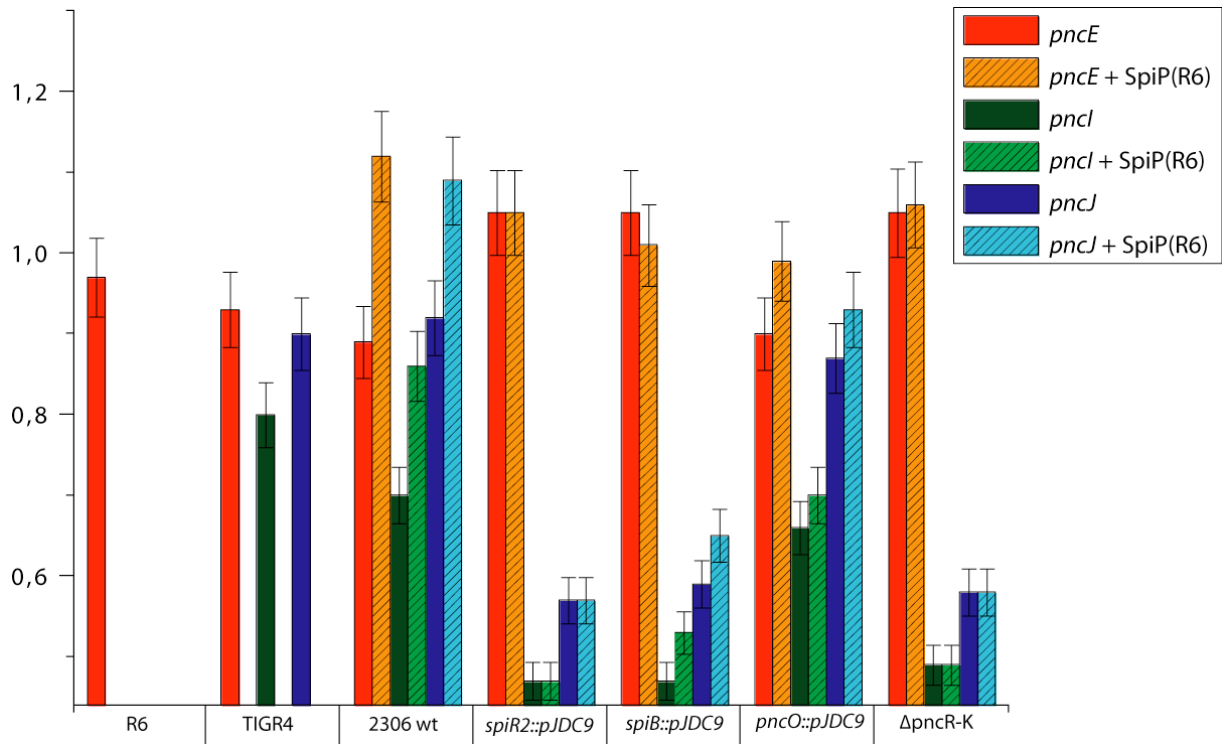
**Abbildung 39.** Schmelzpunktanalyse in *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 (grüne Quadrate), *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (rote Punkte), *S. pneumoniae* 2306Δ*pncR-K* (blaue Dreiecke, Spitze oben) und *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 (orange Dreiecke, Spitze unten). Angeben ist die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegenüber der Temperatur folgender Gene: Lactatdehydrogenase (*ldh*) (A), *pncI* (B), *pncJ* (C) und *pncE* (D). Schwarze Dreiecke (Spitze links) symbolisieren die Non-template Control (NTC).

### 3.8.2 Bacteriocinexpression in induzierten *S. pneumoniae* 2306 Zellen

Durch Zugabe von 100 ng/ml des SpiP(2306)-Peptides ließ sich die Expression der Bacteriocingene in *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp stimulieren. Die Expression von *pncE*, *pncI* und *pncJ* stieg im Vergleich mit der uninduzierten Expression um ca. 30 bis 40 % an (siehe Abb. 40).

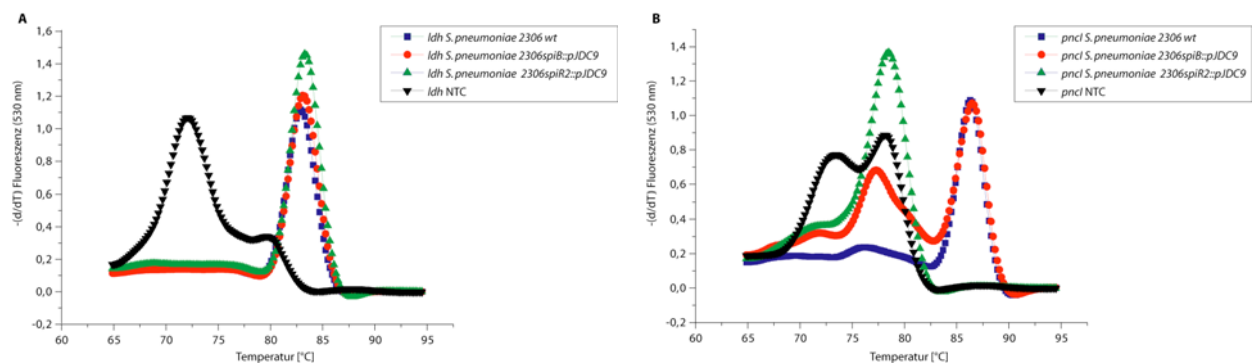
Die Mutanten zeigten ein anderes Bild. Nur *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp. Die Bacteriocinexpression (*pncE*, *pncI* und *pncJ*) stieg um ca. 10 bis 20 % an (siehe Abb. 40). Die Responseregulatoremutante *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 zeigte keine Reaktion auf die Zugabe von SpiP(2306). Es kam zu keiner Steigerung der Expression von *pncE*, *pncI* oder *pncJ* (Abb. 40). Der Stamm *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 zeigte folgende Veränderung in der Expression der Bacteriocingene nach Zugabe von SpiP(2306) (siehe Abb. 40): die Expression der Gene *pncI* und *pncJ* stieg, wenn auch nur wenig an.

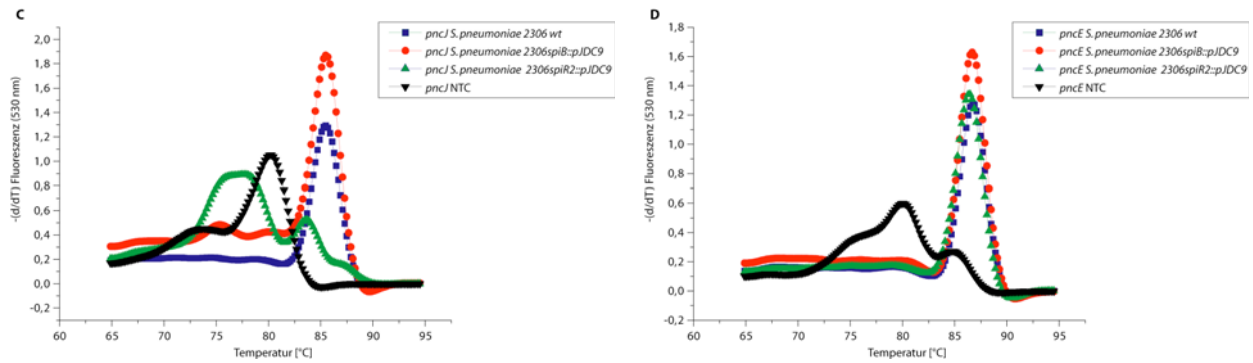
Die leicht erhöhte Expression von *pncE* in der Mutante *S. pneumoniae* 2306Δ*pncR-K* bewegte sich innerhalb der Fehlertoleranz (siehe Abb. 40). Die gemessene Expression der deletierten Gene *pncI* und *pncJ* war wieder auf Verunreinigungen bzw. Primerdimere zurückzuführen, was die Bestimmung des Schmelzpunktes zeigte (siehe Abb. 39B, C).



**Abbildung 40.** Expression der Gene *pncE*, *pncI* und *pncJ* in Relation zur Expression der Lactatdehydrogenase (*ldh*) von *S. pneumoniae* R6, TIGR4, 2306 Wildtyp, sowie den Mutanten von 2306. Ohne Zugabe von Peptid (rot, dunkelgrün und dunkelblau), mit Zugabe von Peptid (orange, hellgrün und hellblau; alle schraffiert). Die X-Achse schneidet die Y-Achse in Höhe Expressionrate der NTC der Lactatdehydrogenase.

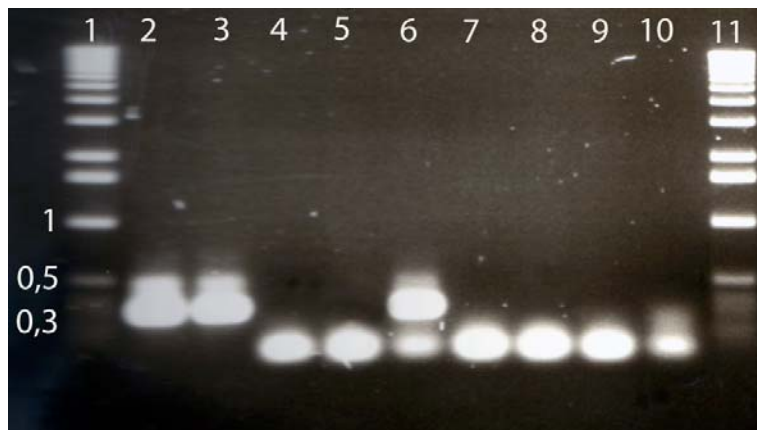
Die Analyse der Schmelzpunkte bestätigte die Daten der Expressionsmessung. Während die induzierten Stämme *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp, *S. pneumoniae* 2306*spiB::pJDC9* und *S. pneumoniae* 2306*pncO::pJDC9* definierte Amplifikationsprodukte von *pncE*, *pncI* und *pncJ* bildeten (siehe Abb. 41B, C, D), ließ sich bei *S. pneumoniae* 2306*spiR2::pJDC9* nur ein definiertes *pncE* Amplifikationsprodukt nachweisen (Abb. 41D). Die Primer für *pncI* und *pncJ* bildeten nur Produkte mit undefinierten Schmelzpunkten (Abb. 41B, C). In allen Stämmen konnte mit dem verwendeten Primerpärchen das Kontrollgen *ldh* korrekt amplifiziert werden (siehe Abbildung 41A).





**Abbildung 41.** Schmelzpunktanalyse bei induzierten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 (grüne Dreiecke, Spitze oben), *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (rote Punkte) und *S. pneumoniae* 2306 Wildtyp (blaue Quatrare) nach Zugabe des synthetischen SpiP(2306) Peptids. Angeben ist die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegenüber der Temperatur folgender Gene: Lactatdehydrogenase (*ldh*) (A), *pncI* (B), *pncJ* (C) und *pncE* (D). Schwarze Dreiecke (Spitze unten) symbolisieren die Non-template Control (NTC).

Zur Kontrolle wurden die RT-PCR Ansätze der *pncJ*-Expressionsmessung auf ein Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 42.** RT-PCR des Gens *pncJ* in *S. pneumoniae* Wildtyp (2), *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (5), und *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 (8), sowie induziert mit SpiP(2306) (3, 6, 9). Die NTC wurde in die Bahnen 4, 7, 10 aufgetragen. 1 und 11 1kb Ladder-Marker (Invitrogen).

Die Größe des RT-PCR-Produktes betrug ca. 320 bp und unterschied sich klar von dem RT-PCR-Produkt der NTC (Abb. 42.4), welchem keine Markerbande zugeordnet werden konnte. Es war kein Unterschied zwischen induzierter (Abb. 42.3) und nicht induzierter Probe (Abb. 42.2) zu erkennen. Die PCR-Produkte der uninduzierten Proben von *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9, *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 und der induzierten Probe von *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 besaßen alle die selbe Größe wie die dazugehörige NTC, was auf unspezifische Amplifikationsprodukte bzw. Primerdimere hindeutete.

Das PCR-Produkt der induzierten Probe von *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 hingegen hatte eine Größe, welche gleich dem Wildtyp war (Abb. 42.6 und 42.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Experimente genügt Hinweise lieferten, sowohl die in den Sequenzen der bereits bekannten *S. pneumoniae*-Stämmen entdeckten Bacteriocine, wie auch die hier neu beschriebenen Bacteriocingene funktionell dem mit dem Bacteriocin-Assay beobachteten Phänotyp zu zuweisen.

Des Weiteren zeigte sich eine essentielle Funktion des *spi*-TCS bei der Ausprägung und Regulation des Bacteriocinphänotypes in *S. pneumoniae*.

Ein weiterer zu diskutierender Punkt der Bacteriocinproduktion in *S. pneumoniae* stellt der Einfluss der CAAX-Peptidase PncO, der durch Versuche mit den Mutanten *S. pneumoniae* 2306*pncO*::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K* deutlich wurde, da.

## 4. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war der biologische Nachweis der Bacteriocinproduktion von *S. pneumoniae*, mit einem im Labor entwickelten Assay-System. Dazu wurden zwanzig pathogene Isolate von *S. pneumoniae* verschiedener Serotypen und unterschiedlicher klonaler Zugehörigkeit auf Bacteriocinproduktion untersucht. Zusätzlich wurden Mutanten in produzierenden Stämmen konstruiert in denen die Bacteriocingenen (*pnc*) deletiert oder Gene des stromaufwärts gelegenen Zwei-Komponenten-Systems (*spi*), das für die Regulation der Bacteriocine verantwortlich sein soll, inaktiviert. Die Bacteriocin-Cluster von fünf und zusätzlich noch die *spi*-Cluster zweier Stämme wurden vollständig sequenziert und sowohl miteinander wie auch mit den bereits bekannten Sequenzen von *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 verglichen. Dadurch sollte die hochvariable Genorganisation in diesem Genombereich und dadurch resultierende Phänotypen auch auf DNA-Sequenzebene detailliert charakterisiert werden.

### 4.1 Auswirkungen der Veränderungen der Wachstumsbedingungen auf die Bacteriocinproduktion

Anpassungen an Änderungen der Umgebungsbedingungen werden von Bakterien über Quorum sensing-Mechanismen reguliert. Dazu zählen unter anderem die Regulation der Kompetenz oder die Biofilmproduktion. Von diesen beiden Phänotypen ist bekannt, dass sie in Abhängigkeit von dem umgebenden  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis stehen (Hoyle & Costerton, 1991; Lacks & Greenberg, 2001; Parente & Ricciardi, 1999). Da auch die Bacteriocinproduktion über einen QS-Mechanismus reguliert wird (Risoen *et al.*, 2000), sollte überprüft werden, ob das  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis Auswirkungen auf die Bacteriocinproduktion hat.

Im Experiment (siehe 3.1.3) zeigt sich nur bei einem bestimmten  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis eine Bacteriocinproduktion, nicht aber bei  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre oder normaler  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Konzentration der Umgebungsluft (Tabelle 22). Das zeigt, dass es ein optimales  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis zur Produktion von Bacteriocinen gibt. Dieses Verhältnis von niedriger  $\text{O}_2$ - und erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration herrscht ebenso in Nasen-, Rachen- oder Lungenraum vor, da die eingeatmete Luft eine konstante  $\text{O}_2$ -Konzentration besitzt, die ausgeatmete Luft mit  $\text{CO}_2$  gesättigt ist. Somit kann es als eine Anpassung an das natürliche Habitat von *S. pneumoniae* angesehen werden, die Produktion von Bacteriocinen abhängig von dem umgebenden  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Verhältnis zu machen.

Die Produktion von Bacteriocinen ist nicht nur vom CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis der Umgebungsluft, sondern auch von der Inkubationstemperatur abhängig. So verlieren bei Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C *S. pneumoniae* TIGR4 und 632 ihre Hemmwirkung auf *M. luteus* und *L. lactis* und der Durchmesser der von *S. pneumoniae* 2306 gebildeten Hemmhöfe verringert sich deutlich (Tabelle 22). Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da 37°C die für *S. pneumoniae* routinemäßig gewählte Wachstumstemperatur im Labor darstellt. Jedoch wird diese Temperatur in ihrem natürlichen Lebensraum, dem Nasen- und Rachenraum, nur selten erreicht. Somit ist die Produktion von Bacteriocinen abhängig von der Temperatur und bildet sich nur unter Bedingungen aus, die dem natürlichen Habitat ähnlich sind. Wie diese temperaturabhängige Regulation erfolgt ist jedoch nicht bekannt.

#### **4.2 Konstruktion von Mutanten in *S. pneumoniae* 2306**

Bei der Auswahl der Stämme spielte ihre Transformierbarkeit und ihr Resistenzprofil eine entscheidende Rolle, da nur von transformierbaren und gegenüber bestimmten Selektionsmarkern sensitiven Stämmen die gewünschten Mutanten erzeugt werden konnten. Obwohl Streptokokken DNA aufnehmen und bei genügender Homologie diese auch ins Genom rekombinieren können, sind manche Stämme unter Laborbedingungen nicht oder nur schwer transformierbar. Dabei spielt z.B. die umgebende Polysaccharid-Kapsel eine Rolle, welche die DNA-Aufnahme erschwert (Bricker & Camilli, 1999; Havarstein *et al.*, 1997; Trzcinski *et al.*, 2003). Weiterhin ist zu beachten, dass der Laborstamm R6 als besonders hochkompetente Mutante isoliert wurde (Hoskins *et al.*, 2001; Hotchkiss, 1951). Umso bemerkenswerter ist es, dass die Stämme 2306 und Hu15 (Reichmann *et al.*, 1995) einen sehr breiten Kompetenzpeak ähnlich dem Stamm R6 bilden und dabei ähnlich hohe Transformationseffizienzen erzielt werden konnten.

Die Anzahl der erhaltenen Transformanten unterschied sich allerdings abhängig von dem verwendeten Plasmid. Mit pGEM-ASB-1 war die Transformationseffizienz mehr als doppelt so hoch, als mit den Plasmiden pJDR1, pJDB2 und pJDO3. Dies ist über die Fragmentgröße und eventuell den erfolgten Integrationsmechanismus ins Genom zu erklären. Die drei Plasmide pJDR1, pJDB2 und pJDO3 besitzen jeweils ein ca. 500 kb großes DNA-Fragment und werden über eine Insertion-Duplikation ins Genom integriert (Chen & Morrison, 1988; Lee *et al.*, 1998; Mejean *et al.*, 1981; Morrison *et al.*, 1984). Dabei wird neben der Duplikation des homologen DNA-Fragmentes auch die gesamte DNA des Plasmids zwischen den beiden duplizierten DNA-Fragmenten eingebaut. (siehe Abbildung 13). Von Morrison

wurde in einer ausführlichen Versuchsserie bei der Verwendung von Fragmenten unter 1 kb die Transformationseffizienz deutlich sinkt (Lee *et al.*, 1998).

Das Plasmid pGEM-ASB-1 besitzt zwei ca. 1 kb große homologe DNA-Fragmente und integriert über einen Doppel-Crossover Mechanismus ins Genom (siehe Abbildung 8). Dabei wird der gesamte DNA-Abschnitt zwischen den begrenzenden homologen DNA-Fragmenten deletiert und durch das ausgewählte Resistenzgen ersetzt. Der übrige Teil des Plasmids integriert nicht (Podbielski *et al.*, 1996; Wang, 2000). Dadurch werden mögliche polare Effekte, wie z.B. durch read-through aus Plasmidgenen, vermieden.

#### **4.3 Das *pnc*-Cluster und die Bacteriocinproduktion von *S. pneumoniae***

Die Ergebnisse (siehe 3.1.1 und Abb. 15) zeigen, dass *S. pneumoniae* TIGR4 im Gegensatz zu *S. pneumoniae* R6 Substanzen in die Agarplatte ausscheidet, welche die Bakterienstämme *Micrococcus luteus* und *Lactococcus lactis* im Wachstum hemmen. Diese Hemmung tritt kreisförmig um die Kolonien des Test-Stammes auf.

Die unterschiedliche Größe der entstanden Hemmhöfe dokumentiert eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Indikatorbakterien auf die produzierten Substanzen auf (Abbildung 15), wobei *M. luteus* empfindlicher *L. lactis* reagiert.

Ob es sich bei diesen Substanzen um Bacteriocine handelt, kann durch dieses Experiment noch nicht eindeutig geklärt werden. Da Durchführung und Aufbau des Assay jedoch von Testsystemen abgeleitet sind, welche für die Darstellung von Bacteriocinen in Lactokokken benutzt werden, kann dieses angenommen werden (Brurberg *et al.*, 1997; Diep *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 2001; Tagg & McGiven, 1971).

Aufgrund dieser Annahme wurden weitere Pneumokokkenstämme untersucht (siehe 3.1.2). Bei den ausgewählten Pneumokokken handelt es sich unter anderem um Isolate aus verschiedenen Ländern eines multi- und hoch Penicillin-resistenten Serotyp 23F Klon (Spain<sup>23F</sup>-1, McGee *et al.*, 2001). Neben diesen wurden das Penicillin-sensitive Isolat *S. pneumoniae* 2306 aus Finnland, ebenfalls Serotyp 23F, aber nicht mit dem spanischen Klon genetisch verwandt, *S. pneumoniae* 628 (Serotyp 9V, Spain<sup>9V</sup>-3) aus Spanien und *S. pneumoniae* Hu15 (Serotyp 19A, Hungary<sup>19A</sup>-6) aus Ungarn ausgewählt. *S. pneumoniae* Hu15 und *S. pneumoniae* 628 sind multiresistent.

Durch eine PCR mit *pnc*-Cluster-spezifischen Primern konnte aus chromosomaler DNA aller oben genannten Stämmen ein DNA-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 16). Die anschließende Sequenzierung und Analyse der erhaltenen Nukleotidsequenzen der Stämme *S. pneumoniae* 2306, 628, 632, F4 und Hu15 und der Vergleich mit den bekannten Sequenzen



von *S. pneumoniae* TIGR4 und R6 (siehe 3.3) bestätigte, dass es sich bei den amplifizierten Produkten um die *pnc*-Cluster der entsprechenden Stämme handelt (siehe Abbildung 19). Somit besitzen alle Stämme, mit Ausnahme von R6, die genetische Voraussetzung zur Produktion von Bacteriocinen mittels dieses Genclusters.

Der danach mit diesen Stämmen durchgeführte Assay zeigte, dass trotzdem nur einige davon Bacteriocinproduzenten sind (siehe Abbildung 17, Tabelle 21). Somit sagt das Vorhandensein der *pnc*-Gene nichts über eine tatsächliche Produktion aus. Zumindest nicht unter den durchgeführten Bedingungen (siehe 3.1.3). Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen, in denen ein negativer Bacteriocinphänotyp von *S. pneumoniae* TIGR4 geschildert wird (Dawid *et al.*, 2006). Jedoch wurden dort unterschiedliche Versuchsbedingungen verwendet, wie z.B. eine Inkubationstemperatur von 37°C, welche für eine Bacteriocinproduktion (s.o.) nicht optimal ist.

Neben den Inkubationsbedingungen kann es grundsätzlich noch weitere Gründe für eine Produktion oder Nichtproduktion geben:

(i) auf Ebene der Regulation: Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Punktmutationen oder unterschiedliche Genorganisationen innerhalb des *spi*- oder *pnc*-Clusters die Induktion der Transkription beeinflussen. Dies könnte das Zwei-Komponenten-System selbst, oder den für die Prozessierung und das Exkretieren des SpiP Peptidpheromons nötigen ABC-Transporter betreffen. Mutationen, die diese Gene funktionell beeinträchtigen, würden somit zu einer fehlenden Induktion der Bacteriocin-Strukturgene führen.

(ii) direkt auf der Ebene der Transkription: Die Rearrangements im *pnc*-Cluster selbst (bzw. integrierte IS-Elemente) könnten eine optimale Transkription beeinflussen, obwohl die Regulation prinzipiell intakt ist. Dies scheint bei einem hochvariablen Genombereich, wie dem *pnc*-Cluster, durchaus möglich.

(iii) auf der Ebene der Translation bzw. der posttranslationellen Modifikationen: Sollte eine effiziente Prozessierung nicht stattfinden, oder der Export der Bacteriocine gestört sein, würde dies ebenso zu einem negativen Bacteriocinphänotyp führen, verursacht etwa durch Mutationen im ABC-Transporter bzw. in den Leaderpeptidbereichen der Bacteriocinpeptide selbst. Den sicheren Beweis, dass die beobachtete Hemmung tatsächlich auf die im *pnc*-Cluster codierten Bacteriocine zurückzuführen ist, zeigt die Deletion-Mutante des *pnc*-Clusters in *S. pneumoniae* TIGR4. Diese Mutante verhält sich im Assay negativ (Lux *et al.*, 2007).

Der Phänotyp bezüglich der Hemmung anderer Stämme variiert auch innerhalb eines Klon. Dies wird bei der Betrachtung des Spain<sup>23F</sup>-1 Klon deutlich. Es zeigten nur 10 von 18

getesteten Stämmen im Assay einen positiven Bacteriocinphänotyp, obwohl alle untersuchten Stämme ein gleichgroßes *pnc*-Cluster enthalten (siehe Abb. 16 und 19). Die Ursache dafür ist nicht bekannt.

#### 4.4 Unterschiede der *pnc*- und *spi*-Cluster verschiedener Stämme von *S. pneumoniae*

Das *com*-System reguliert die Fähigkeit der extrazellulären DNA-Aufnahme nach einem grundsätzlich gleichen Quorum sensing-Mechanismus wie das *spi*-System.

Die Sequenz des Kompetenzpheromons CSP weist stammspezifische Unterschiede auf, die dazu führen, dass es nur von einem Pneumokokkenstamm mit korrespondierendem ComD-Allel erkannt wird (Pozzi *et al.*, 1996). Gleiches wurde auch für das Peptidpheromon des *spi*-TCS SpiP nachgewiesen. So zeigt die Zugabe von SpiP des Stammes *S. pneumoniae* TIGR4 keine Induktion des *spi*-Systems von *S. pneumoniae* R6 (Reichmann & Hakenbeck, 2000).

Vergleicht man die AS-Sequenzen der SpiP-Peptide der Stämme *S. pneumoniae* 2306, R6, TIGR4 und 628 (Abbildung 23) so lassen sich diese auf Basis ihrer Ähnlichkeiten in zwei Gruppen einordnen: *S. pneumoniae* R6 und 2306 auf der einen Seite, andererseits *S. pneumoniae* TIGR4 und 628. Entsprechend besitzen zum Beispiel die beiden Stämme *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* 2306 identische Histidinkinasen SpiH (siehe Abb. 22) und ABC-Transporter SpiABCD (Abb. 24 bis 26). Dies zeigt die notwendige Kompatibilität der Histidinkinase und des prozessierenden ABC-Transporters zur Pheromonsequenz auf (Diep *et al.*, 1995; Havarstein *et al.*, 1995b; Kotake *et al.*, 2008).

Neben den Unterschieden auf Nukleotid- bzw. Proteinebene bedarf auch die Organisation der Gene des ABC-Transporters SpiABCD besonderer Betrachtung. So sind in *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* 2306 die Gene *spiB* und *spiC* in einem einzigen ORF zusammengefasst, während diese Gene in *S. pneumoniae* TIGR4 jeweils als einzelne ORFs vorliegen. Dies bedeutet, dass in 2306 und R6 die Transmembrandomäne SpiB und die ATP-Bindedomäne SpiC von einem einzelnen Zwei-Domänen Protein gebildet werden, wohingegen beide Domänen in TIGR4 und 628 zwei getrennte Proteine darstellen. Weiterhin ist das Gen *spiD* in TIGR4 ein einzelner ORF, in 2306 und R6 ist dieses Gen in zwei ORFs *spiD1* und *spiD2* geteilt. Das Gen *spiA*, welches für die Peptidasedomäne des Transporters codiert, ist in allen drei Stämmen als einzelner ORF organisiert. Eine andere Anordnung findet man in *S. pneumoniae* 670. Dort wird der SpiABCD-Transporter nur von einem einzigen ORF, und somit von einem Multidomänen-Protein, gebildet. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen weit verbreiteten multi-resistenten Klon des Serotyps 6B (Spain<sup>6B</sup>-2, Hiller *et al.*, 2007; Reichmann *et al.*, 1995). Die Ursache für diese unterschiedliche Domänenorganisation ist

unklar. Beim ComAB-System wurde vergleichbares nicht beobachtet. Die Aufspaltung bzw. Fusion von Einzelgenen, welche für funktionelle, interagierende Proteindomänen codieren wird gelegentlich bei orthologen Genen in verschiedenen Spezies beobachtet (Rosetta Stone Hypothese, Suhre, 2007). Innerhalb einer Spezies tritt dies üblicherweise nicht auf. Diese Unterschiede scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Funktion des Transporters zu nehmen. Die Einzelgene weisen jeweils funktionelle Shine-Dalgarno-Sequenzen und Start-Codons auf. Des Weiteren sind die entsprechenden Domänenaufspaltungen auch in genetisch nicht verwandten Klonen zu beobachten (2306/R6, TIGR4/628).

Über den Responseregulator SpiR2 wird die Induktion der Transkription der *pnc*-Gene gesteuert. Hier können sich Punktmutationen in Receiver- bzw. DNA-Bindedomäne entweder in einer schlechten Phosphorylierung von SpiR2 durch die Histidinkinase, oder einer schlechteren Bindung an die SpiR2-Promoterbindestelle stromaufwärts der *pnc*-Gene auswirken. Ein Vergleich der AS-Sequenzen zeigt, dass die Mehrzahl der AS-Austausche sich in der Receiverdomäne befindet, jedoch nicht in Nähe des aktiven Zentrums. Ob dies dennoch die Funktion beeinträchtigt kann nicht gesagt werden.

Die Sequenzierung der erhaltenen *pnc*-Cluster PCR-Fragmente, welche die möglichen *pnc*-Cluster der ausgewählten Stämmen darstellen, zeigt, dass sich auf diesen Fragmenten ORFs identifizieren lassen, die eine hohe Ähnlichkeit zu bereits bekannten Bacteriocingenen besitzen (vergleiche Tabelle B1) (de Saizieu *et al.*, 2000; Jack *et al.*, 1995; Reichmann & Hakenbeck, 2000; Tagg *et al.*, 1976). Ihre Analyse zeigt Unterschiede in der Organisation, Anzahl und Aminosäure-Sequenzen dieser Gene innerhalb des Clusters einzelner Stämme.

Die Bacteriocine lassen sich basierend auf ihrer Sequenz und Eigenschaften dennoch in eine der Klassen, die in 1.4. beschrieben sind, zuordnen. So spricht das Fehlen der Aktivität gegen Listerien und die Organisation der Gene für Bacteriocine der Klasse IIb. Repetitive DNA-Sequenzen, wie sie vor allem im Bereich der konservierten Leaderpeptide vorkommen, ermöglichen Rekombinationen in den Bacteriocingenen und dadurch die Entstehung von Sequenzvarianten der Ausgangsgene. So besitzt das nur in 2306 vorkommende Bacteriocin PncR eine dem Bacteriocin PncA ähnliche Leaderpeptid-Sequenz mit nur vier Aminosäure-Austauschen, wohingegen die Sequenz des Propeptids zu keinem bekannten Bacteriocin ähnlich ist. Auch die Sequenz von PncT ist keinem bekannten Bacteriocin ähnlich. Ob alle diese Sequenzvarianten auch funktionelle Bacteriocine darstellen, lässt sich ohne eine detaillierte Mutagenese der Einzelgene nicht sagen. Falls die Peptide nur in Komplexen aktiv sind, wie für Zwei-Peptid Bacteriocine beschrieben, können Veränderungen in nur einem Peptid die biologische Aktivität des Gesamtkomplexes verändern oder inaktivieren.

Neben den Abweichungen in der AS-Sequenz der Bacteriocine finden sich auch Unterschiede in der Sequenz des Proteins PncG. Dieses Protein gehört zusammen mit PncKMN und PncQ zu den Immunitätsproteinen. Diese vermitteln Immunität gegenüber den ausgeschiedenen Bacteriocinen (Abee, 1995; Gajic *et al.*, 2003; Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Saris *et al.*, 1996). Solche Proteine kommen im Allgemeinen stromabwärts von Bacteriocingenen vor und sind durch zwei Transmembranhelices gekennzeichnet (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Bei Klasse IIa Bacteriocinen wurde gezeigt, dass die Immunitätsproteine mit ihrem konservierten C-Terminus diese Bacteriocine erkennen (Johnsen *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005).

Für Immunitätsproteine von Colicinen, der mit am besten untersuchten Bacteriocine, hat man nachgewiesen, dass sie mit der porenbildenden Domäne der Colicine interagieren können und dadurch den Produzentenstamm schützen (Dayem *et al.*, 1996; Venema *et al.*, 1994). Ein ähnlicher Mechanismus kann auch für die Immunitätsproteine der Klasse IIb Bacteriocinen angenommen werden.

Die meisten Unterschiede innerhalb der Immunitätsproteine finden sich bei PncG (2306) vor allem in der C-terminalen Domäne, was eine durch korrelierte Mutationen bedingte mögliche Anpassung an die im Vergleich zu den anderen Stämmen veränderten Bacteriocine PncR und PncT darstellen könnte. Die übrigen Immunitätsproteine sind in allen Stämmen, bis auf einen Aminosäuren-Austausch in PncM (TIGR4) (siehe Abbildung 28) identisch.

Ebenfalls eine mögliche Rolle bei der Entwicklung der Immunität und des Bacteriocinphänotyps spielen die zur Familie der CAAX-Proteasen gehörenden Proteine PncO und PncP. Dabei handelt es sich um Proteine, die zu einer Superfamilie von Metallo-Proteasen gehören, die bei Eukaryonten eine wichtige Rolle bei der Modifikation und Sekretion von Membranproteinen spielen (siehe Abb. 29) (Pei & Grishin, 2001; Wright & Philips, 2006). Der Einfluss von PncO auf die Immunität wird auch durch die Experimente mit der Mutante *S. pneumoniae* 2306S. pneumoniae 2306 Wildtyp gehemmt wird (Abb. 36C), während der Wildtyp mit intaktem Gen *pncO*, sich nicht selber hemmt (Abb. 36E). Da eine PncP-Mutante von 2306 keinen Effekt auf die Immunität zeigt scheint einzig PncO für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich zu sein (Lux *et al.*, 2007).

Eine weitere mögliche Rolle von PncO könnte die Prozessierung der Bacteriocine (Lavy *et al.*, 2002; Pei & Grishin, 2001; Reinicke *et al.*, 2005) selbst sein.

Der Bereich zwischen *pncT* und *pncG* enthält im Stamm *S. pneumoniae* 2306 eine nicht-kodierende Nukleotidsequenz unklarer Funktion (Abbildung 19). Das IS-Element IS1381 bzw. verkürzte Teile davon finden sich in den Stämmen *S. pneumoniae* 2306 und TIGR4.

Dies und die hohe Sequenzvariabilität der Region innerhalb der untersuchten Stämme zeigen an, dass es hier im Verlaufe der Stammevolution zu häufigen Rekombinationsereignissen gekommen ist.

#### **4.5 Ein funktionelles *spi*-Cluster ist für eine Bacteriocinproduktion und Immunität entscheidend**

Die Ergebnisse der Durchführungen des Assays mit den Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9, *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 (siehe 3.5.1) zeigen, dass ein funktionsfähiges *spi*-Cluster für einen positiven Bacteriocinphänotyp notwendig ist. Dies kann durch folgenden theoretischen Regulationsmechanismus erläutert werden:

Das durch den SpiABC-Transporter prozessierte und ausgeschiedene SpiP-Peptid interagiert mit dem Sensor der Histidinkinase SpiH, was zu einer Konformationsänderung führt. Dadurch wird unter ATP-Verbrauch ein Phosphat-Rest an den konservierten Histidin-Rest an Position 254 (siehe Abb. 22) übertragen, welcher an den Responseregulator SpiR2 weitergegeben wird. Der phosphorylierte Responseregulator SpiR2 bindet als Dimer an seinen spezifischen Bindestellen innerhalb des *spi*- und *pnc*-Clusters (siehe Abb. 19 und 3.3.4) und stimuliert die Gentranskription. Dies geschieht in *S. pneumoniae* 2306 in vier Transkriptionseinheiten: (1) *spiR1*, *spiR2* und *spiH* bilden eine Einheit, (2) die Gene des SpiABC-Transporter, (3) die Bacteriocingene *pncRT*, das Immunitätsgen *pncG*, das Gen *pncS* und (4) die Bacteriocingene *pncIJ*, die Immunitätsgene *pncKQ*, das Gen *pncW* und die Gene der CAAX-Peptidasen PncO und PncP (siehe Abbildung 19).

In den Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 werden durch die inaktivierten Gene *spiR2* und *spiB* zum einen der Export (in *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9) von SpiP, zum anderen die transkriptionelle Regulation (in *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9) unterbrochen. Beide Mutationen bewirken so den Verlust der Stimulation der Transkription der Gene des *pnc*- und des *spi*-Clusters. Dies lässt sich nicht nur durch den negativen Bacteriocinphänotyp der Mutanten (siehe Abbildung 35A, B), sondern auch durch die Nicht-Expression der Gene *pncI* und *pncJ* in den RT-PCR Experimenten (siehe Abbildungen 39 und 40) nachweisen.

Der Verlust der Expression der Bacteriocingene, die durch den inaktivierten ABC-Transporter verursacht wird, sollte durch Zugabe von synthetischem SpiP-Peptid wieder rückgängig gemacht werden können. Das Wachstumsexperiment (siehe 3.7) gibt einen ersten Hinweis auf die Komplementierbarkeit der SpiABCD-Transportermutante *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9. Wird SpiP(2306) in steigenden Konzentrationen zugegeben, so zeigt die

Mutante einem dem Wachstum des Wildtyps ähnlichen Verlauf (Abb. 37A, C). Dies könnte sich als eine Auswirkung einer Peptid-Überproduktion erklären lassen. Dadurch kann es zu einer unphysiologischen Dichte von Proteinen (Bacteriocine, Immunitäts- und Membranproteinen) in der Zellmembran kommen. *S. pneumoniae* R6 zeigt trotz Zugabe keine Veränderungen im Wachstumsverlauf, was erstens eine cytotoxische Wirkung des SpiP-Peptidpheromons ausschließt und zweites einen Effekt im Zusammenhang mit den Genen des *pnc*-Clusters bestätigt (Abb. 37B). Da *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 ebenfalls nicht im Wachstum beeinträchtigt wird, bestärkt dies die Annahme einer durch SpiP ausgelösten regulatorischen Folgeerscheinung (Abb. 37D).

Die Ergebnisse der RT-PCR unterstützen diesen Hinweis, dass ein funktionelles *spi*-System für die Bacteriocinproduktion benötigt wird. In den Versuchen mit uninduzierten Zellen werden die Gene *pncI* und *pncJ* in beiden Mutanten *S. pneumoniae* 2306*spiR2*::pJDC9 und *S. pneumoniae* 2306*spiB*::pJDC9 nicht mehr transkribiert (siehe Abb. 39 und 40). Durch Zugabe von 100 ng/ml SpiP-Peptid kann die Expression der Bacteriocingene *pncI* und *pncJ* nur in der Transportermutante wiederhergestellt werden. Dabei erreicht die Expression jedoch nicht den Wert des Wildtyps, sondern liegt nur knapp über der uninduzierten Expression. Die anschließende Schmelzpunkt-Analyse zeigt jedoch, dass es sich bei den amplifizierten Produkten um die Gene *pncI* und *pncJ* handelt.

Eine Deletion des Genes *pncO* resultiert ebenso in einem negativen Bacteriocinphänotyp, obwohl die Gene *pncI* und *pncJ* weiterhin exprimiert werden, was durch die RT-PCR Experimente nachgewiesen ist (Abb. 40). Die Expression ist jedoch nicht auf Niveau des Wildtyps. Der mit dem Wildtyp identische Peak der Schmelzkurvenanalyse beweist eine eindeutige Expression von *pncI* und *pncJ* (Abbildung 38).

Dies wurde nur in Flüssigkultur getestet. Ob sich auch ein positiver Bacteriocinphänotyp in dem Platten-Assay zeigen würde, wurde nicht getestet. Allerdings ist dabei zu beachten, dass sich Quorum sensing-Systeme in Flüssigkultur anders als auf Festmedien (vgl. Biofilmformation) verhalten können (Oggioni *et al.*, 2006).

#### **4.6 Der positive Bacteriocinphänotyp der Mutante *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K***

Die Mutante *S. pneumoniae* 2306 $\Delta$ *pncR-K* weist auch weiterhin einen positiven Bacteriocinphänotyp aus, obwohl hier alle Bacteriocingene innerhalb des *pnc*-Clusters deletiert wurden (siehe Abbildung 32E). Dies wurde durch die Sequenzierung der Mutante bestätigt.

Der genetische Background dieses Stammes ist nicht bekannt und es können durchaus weitere Bacteriocine im Genom von *S. pneumoniae* 2306 vorhanden sein, die einen positiven Phänotyp bewirken. So konnte eine Homolog des Bacteriocins PncE, welches man auch in *S. pneumoniae* R6 (ThmA) und *S. pneumoniae* TIGR4 (BlpU) und stromaufwärts des Genes *comA* liegt, gefunden werden. In letztgenanntem Stamm ist überdies noch eine weitere Kopie des Gens in dessen *pnc*-Cluster (*pncE2*) vorhanden. Über die RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass dieses Gen in 2306 transkribiert wird, auch wenn keinen genauen Angaben zur Lokalisation auf dem Genom von 2306 gemacht werden konnten (Abbildungen 38, 39, 40 und 41). Es ist zwar das Gen selbst mittels flankierender Primer per PCR zu amplifizieren, aber nicht die flankierenden Bereiche (siehe Abbildung 35). Dies liegt vermutlich an dem sehr variablen Sequenzbereich in dieser Region stromaufwärts von *comA*, die schon sowohl in TIGR4 als auch in R6 verschieden ist und sowohl die IS-Elemente IS1381 und IS1167 enthält, die an anderen Stellen mehrfach in den Genomen vorkommen (Sanchez-Beato *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1995). Untersucht man die Expression von *pncE*(2306) in den übrigen Mutanten genauer, stellt man fest, dass es durch Inaktivierung des *spi*-Clusters nicht zu einem Wegfall der *pncE*-Expression kommt (Abb. 39D, 40 und 41D). Die Expression von *pncE* ist also entweder konstitutiv, oder das Gen steht noch unter anderer regulatorischer Kontrolle (Abb. 40). Dennoch wird es offenbar (auch) durch SpiP reguliert, wie das Ansteigen der *pncE*-Expression nach SpiP-Induktion im 2306 Wildtyp zeigt (Abb. 40). Dies korreliert ebenfalls mit dem Vorhandensein einer *pnc*-homologen Promoterstruktur im 5'-Bereich des Gens in den Stämmen R6 und TIGR4. Möglich ist auch eine Kreuzregulation durch das *com*-System, wie für den *qsrAB*-Transporter beschrieben (Knutsen *et al.*, 2004).

Zumindest in *S. pneumoniae* R6 und TIGR4 ist das Gen nicht an der Bacteriocinproduktion beteiligt: in R6 wird dieses Gen exprimiert, der Stamm besitzt aber einen negativen Phänotyp (Abb. 40) und die Deletion des Bacteriocinclusters in TIGR4 führt ebenfalls zu einem negativen Phänotyp (Lux *et al.*, 2007).

#### **4.7 Wirkspektren der produzierten Bacteriocine und Vorteile einer Bacteriocinproduktion**

Die von *S. pneumoniae* produzierten Bacteriocine sind nicht nur gegen Stämme der gleichen Spezies, sondern auch gegen nahe verwandte Arten, u. a. *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* und *S. pyogenes* aktiv. Diese finden sich im gleichen Habitat wie Pneumokokken wieder und die Produktion von Substanzen, welche mögliche Konkurrenten in ihrem Wachstum hemmen, stellt einen Vorteil bei der Besiedlung des Nasen- und Rachenraumes dar.

Die deutlichsten Wachstumshemmungen wurden bei *M. luteus* und *L. lactis* offenbar: diese Spezies gelten generell als sensitiv gegenüber Bacteriocinen und wurden deswegen auch für den Assay ausgewählt. *M. luteus* kommt gelegentlich auf der Haut vor, ist aber ebenso wie *L. lactis* kein obligater Schleimhautbesiedler. Die phylogenetisch von Streptokokken weiter entfernten Bakterien *Staphylococcus aureus* 113, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Bacillus subtilis* DB43 und *Pseudomonas putida* DSM50996 werden nicht inhibiert.

Die Allolyse in Pneumokokken, welche die Lyse von nicht-kompetenten Zellen durch kompetente Zellen derselben Pneumokokkenpopulation beschreibt findet zumindest im Labor zu einer anderen Zelldichte statt (mittlere exponentielle Wachstumsphase), als die Bacteriocinproduktion (frühe stationäre Phase) bei der andere Pneumokokkenstämme inhibiert und vermutlich lysiert werden. Unter beiden Bedingungen erhöht sich so die Konzentration von freier DNA, und dadurch die Wahrscheinlichkeit für genetische Rekombinationen über horizontalen Gentransfer (Claverys & Havarstein, 2007; Claverys *et al.*, 2007; Havarstein *et al.*, 2006).

Durch die Bacteriocinproduktion mag sich der Produzent eher durch Hemmung anderer Spezies einen Vorteil während der Besiedlung einer ökologischen Nische wie dem Nasen-Rachenraum zu verschaffen in der z.B. die Pneumokokken nicht permanent vorkommen. Unter diesem Aspekt ist es bemerkenswert, dass *S. pneumoniae* 632, der zu einem der weltweit verbreiteten, d.h. erfolgreichsten resistenten Klone gehört, das breiteste Wirkungsspektrum und den deutlichsten Phänotyp der untersuchten Stämme besitzt. Warum *S. pneumoniae* 632 ebenfalls die beiden Stämme *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* 2306 hemmt, obwohl beide Stämme auch das Immunitätsprotein PncG besitzen, liegt möglicherweise an der unterschiedlichen Sequenz des C-Terminus (Abb. 28). Dieser spielt vermutlich eine Rolle bei Spezifität der Immunität (s. o.).

Die Kenntnis über die Komponenten und Mechanismen, welche eine erfolgreiche Besiedlung von pathogenen Spezies und deren Ausbreitung ermöglichen, bietet Ansätze zu neuen Therapieformen. Die hier vorgestellten Ergebnisse könnten hierzu einen Beitrag leisten. Beispielsweise liefert die Darstellung von Peptidanaloga, die in Peptid-vermittelte Quorum Sensing-Mechanismen eingreifen, interessante Möglichkeiten. Diese könnten als Hemmstoffe sowohl der Kompetenz, als auch der Bacteriocinproduktion eingesetzt werden, beides Prozesse, die mit der Biofilmbildung und damit der Besiedlung in Verbindung gebracht werden. Ihre Komponenten stellen somit interessante neue Targetstrukturen für derartige



Wirkstoffe dar (Barrett *et al.*, 1998; Beier & Gross, 2006; Blue & Mitchell, 2003; Paterson *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 1999).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte durch ein Assay-System, das ausgehend von publizierten Methoden für *S. pneumoniae* adaptiert wurde, eine inter- und intraspezies Inhibierung anderer Stämme nachgewiesen werden. Dies gilt für die zwei *S. pneumoniae* TIGR4 und R6 in denen Bacteriocingene beschrieben waren ebenso, wie für Vertreter global verbreiteter Isolate verschiedener Serotypen und unterschiedlicher klonaler Zugehörigkeit.

Da bei den verschiedenen Stämmen Unterschiede in der Hemmstärke und im Wirkspektrum beobachtet wurden, wurde sowohl das die Bacteriocingene enthaltene *pnc*-Cluster, wie auch das *spi*-Regulationscluster einiger Stämme sequenziert und genauer analysiert. Einige der im *pnc*-Cluster von *S. pneumoniae* identifizierten ORFs ließen sich anhand der Merkmale ihrer Genprodukte zu Bacteriocinen der Klasse IIb zu ordnen. Sie besitzen alle gut konservierte Leader-Peptide, variieren jedoch in der AS-Sequenz und im pI ihrer Propeptide. Des Weiteren befinden sich Gene für Immunitätsproteine, Membranproteine, IS-Elemente, CAAX-Proteasen und hypothetische Proteine in den untersuchten *pnc*-Clustern. Das *spi*-Cluster zeigte bereits in vorhergehenden Versuchen Einfluss auf die Regulation der stromabwärts gelegenen Gene des *pnc*-Clusters (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000). Es ließen sich z.T. Unterschiede in den AS-Sequenzen der Histidinkinase SpiH, dem ABC-Transporter SpiABCD und dem Peptidpheromon SpiP zwischen den untersuchten Stämmen erkennen. Damit ließ sich die Selektivität des QS-Regulationsmechanismus, wie er bereits beschrieben wurde, erklären (de Saizieu *et al.*, 2000; Reichmann & Hakenbeck, 2000).

Die Bedeutung des *spi*-TCS, des SpiABCD-Transporter und der CAAX-Protease für Regulation, Produktion und Immunität der Bacteriocinproduktion konnte durch Mutationsanalyse am Beispiel von *S. pneumoniae* 2306 nachgewiesen werden. Offensichtlich existieren im Stamm *S. pneumoniae* 2306 jedoch noch andere Bacteriocingene ausserhalb des *pnc*-Clusters, die u.a. auf Grund fehlender genomischer Information nicht identifiziert werden konnten.

Die biologische Bedeutung der Bacteriocinproduktion ist vermutlich im Konkurrenzkampf um ökologische Nischen, bzw. Steigerung von möglichen DNA-Rekombinationsereignissen in natürlich kompetenten Streptokokkenspezies durch erhöhte Freisetzung von DNA verwandter Arten zu sehen.

Als ein besonders starker Bacteriocinproduzent mit einem breiten Wirkspektrum stellte sich *S. pneumoniae* 632 heraus. Dies könnte auf einen Zusammenhang mit der globalen Verbreitung hindeuten und stellt somit einen interessanten Aspekt für weitere Forschungen dar.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abee, T. (1995).** Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol Lett* **129**, 1-10.

**Alloing, G., Granadel, C., Morrison, D. A. & Claverys, J. P. (1996).** Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **21**, 471-478.

**Altena, K., Guder, A., Cramer, C. & Bierbaum, G. (2000).** Biosynthesis of the Lantibiotic Mersacidin: Organization of a Type B Lantibiotic Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2565-2571.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

**Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J. & Schwager, C. (1986).** A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *J Biochem Biophys Methods* **13**, 315-323.

**Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. & Zenke, M. (1987).** Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **15**, 4593-4602.

**Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. (1944).** Studies On The Chemical Nature Of The Substance Inducing Transformation Of Pneumococcal Types: Induction OF Transformation By A Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. *J Exp Med* **79**, 137-158.

**Barefoot, S. F. & Klaenhammer, T. R. (1984).** Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob Agents Chemother* **26**, 328-334.

**Barefoot, S. F., Chen, Y. R., Hughes, T. A., Bodine, A. B., Shearer, M. Y. & Hughes, M. D. (1994).** Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3522-3528.

**Barnes, D. M., Whittier, S., Gilligan, P. H., Soares, S., Tomasz, A. & Henderson, F. W. (1995).** Transmission of multidrug-resistant serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain in vivo. *J Infect Dis* **171**, 890-896.

**Barrett, J. F., Goldschmidt, R. M., Lawrence, L. E. & other authors (1998).** Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5317-5322.

**Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S. R., Howe, K. L. & Sonnhammer, E. L. (2000).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **28**, 263-266.

**Beier, D. & Gross, R. (2006).** Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**, 143-152.

- Bentley, S. D., Aanensen, D. M., Mavroidi, A. & other authors (2006).** Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS genetics* **2**, e31.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blue, C. E. & Mitchell, T. J. (2003).** Contribution of a response regulator to the virulence of *Streptococcus pneumoniae* is strain dependent. *Infect Immun* **71**, 4405-4413.
- Bonev, B. B., Gilbert, R. J., Andrew, P. W., Byron, O. & Watts, A. (2001).** Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J Biol Chem* **276**, 5714-5719.
- Bricker, A. L. & Camilli, A. (1999).** Transformation of a type 4 encapsulated strain of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 131-135.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. & Sahl, H. G. (1995).** Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 714-719.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P. E. & Sahl, H. G. (1997).** The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur J Biochem* **246**, 193-199.
- Bruno, M. E. & Montville, T. J. (1993).** Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3003-3010.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F. & Eijsink, V. G. (1997).** Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol Microbiol* **26**, 347-360.
- Bucher, P. (1999).** Regulatory elements and expression profiles. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 400-407.
- Campbell, E. A., Choi, S. Y. & Masure, H. R. (1998).** A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Mol Microbiol* **27**, 929-939.
- Chen, J. D. & Morrison, D. A. (1988).** Construction and properties of a new insertion vector, pJDC9, that is protected by transcriptional terminators and useful for cloning of DNA from *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **64**, 155-164.
- Chen, Y., Ludescher, R. D. & Montville, T. J. (1997a).** Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M. & Montville, T. J. (1997b).** Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol* **63**, 524-531.
- Claverys, J. P. & Havarstein, L. S. (2007).** Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. *Nat Rev Microbiol* **5**, 219-229.

**Claverys, J. P., Martin, B. & Havarstein, L. S. (2007).** Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol Microbiol* **64**, 1423-1433.

**Corpet, F. (1988).** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-10890.

**Dawid, S., Roche, A. M. & Weiser, J. N. (2006).** The blp bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* mediate intraspecies competition both in vitro and in vivo. *Infect Immun.*

**Dayem, M. A., Fleury, Y., Devilliers, G., Chaboisseau, E., Girard, R., Nicolas, P. & Delfour, A. (1996).** The putative immunity protein of the gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides* is preferentially located in the cytoplasm compartment. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 251-259.

**de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T. J., Keck, W., Amrein, K. E. & Lange, R. (2000).** Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* **182**, 4696-4703.

**Diep, D. B., Havarstein, L. S. & Nes, I. F. (1995).** A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol* **18**, 631-639.

**Diep, D. B., Havarstein, L. S. & Nes, I. F. (1996).** Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol* **178**, 4472-4483.

**Diep, D. B., Johnsborg, O., Risoen, P. A. & Nes, I. F. (2001).** Evidence for dual functionality of the operon plnABCD in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *Mol Microbiol* **41**, 633-644.

**Eijsink, V. G., Brurberg, M. B., Middelhoven, P. H. & Nes, I. F. (1996).** Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J Bacteriol* **178**, 2232-2237.

**Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J. C. & Hasselmann, C. (1996).** Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4381-4387.

**Ewing, B. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.

**Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. & Green, P. (1998).** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**, 175-185.

**Feldman, C., Read, R., Rutman, A. & other authors (1992).** The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with intact human respiratory mucosa in vitro. *Eur Respir J* **5**, 576-583.

**Freeman, M., Baehler, C. & Spotts, S. (1990).** Automated laser-fluorescence sequencing. *Biotechnology (N Y)* **8**, 147-148.

**Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.

**Gajic, O., Buist, G., Kojic, M., Topisirovic, L., Kuipers, O. P. & Kok, J. (2003).** Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J Biol Chem* **278**, 34291-34298.

**Gonzalez-Pastor, J. E., Hobbs, E. C. & Losick, R. (2003).** Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510-513.

**Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (1998).** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* **8**, 195-202.

**Gross, E. & Morell, J. L. (1971).** The structure of nisin. *J Am Chem Soc* **93**, 4634-4635.

**Guder, A., Wiedemann, I. & Sahl, H. G. (2000).** Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopolymers* **55**, 62-73.

**Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B. & Claverys, J. P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8710-8715.

**Hakenbeck, R., Tarpay, M. & Tomasz, A. (1980).** Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **17**, 364-371.

**Hakenbeck, R. & Hof, H. (1991).** Relatedness of penicillin-binding proteins from various *Listeria* species. *FEMS Microbiol Lett* **68**, 191-195.

**Handwerger, S. & Tomasz, A. (1986).** Alterations in penicillin-binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low levels of penicillin resistance. *J Infect Dis* **153**, 83-89.

**Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1991).** Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol* **173**, 7491-7500.

**Havarstein, L. S., Holo, H. & Nes, I. F. (1994).** The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* **140** ( Pt 9), 2383-2389.

**Havarstein, L. S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. A. (1995a).** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11140-11144.

**Havarstein, L. S., Diep, D. B. & Nes, I. F. (1995b).** A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* **16**, 229-240.

**Havarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F. & Morrison, D. A. (1996).** Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol Microbiol* **21**, 863-869.

**Havarstein, L. S., Hakenbeck, R. & Gaustad, P. (1997).** Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change pherotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol* **179**, 6589-6594.

**Havarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. & Claverys, J. P. (2006).** New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* **59**, 1297-1307.

**Hiller, N. L., Janto, B., Hogg, J. S. & other authors (2007).** Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. *J Bacteriol* **189**, 8186-8195.

**Hod, Y. (1992).** A simplified ribonuclease protection assay. *Biotechniques* **13**, 852-854.

**Hoskins, J., Alborn, W. E., Jr., Arnold, J. & other authors (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**, 5709-5717.

**Hotchkiss, R. D. (1951).** Transfer of penicillin resistance in pneumococci by the desoxyribonucleate derived from resistant cultures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**, 457-461.

**Hoyle, B. D. & Costerton, J. W. (1991).** Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung* **37**, 91-105.

**Iannelli, F., Oggioni, M. R. & Pozzi, G. (2005).** Sensor domain of histidine kinase ComD confers competence pherotype specificity in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 321-326.

**Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* **59**, 171-200.

**Jedrzejewski, M. J. (2001).** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 187-207.

**Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1986).** Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol* **167**, 439-446.

**Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1990).** Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol* **172**, 6339-6347.

**Johnsen, L., Fimland, G., Mantzilas, D. & Nissen-Meyer, J. (2004).** Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl Environ Microbiol* **70**, 2647-2652.

- Johnsen, L., Fimland, G. & Nissen-Meyer, J. (2005).** The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem* **280**, 9243-9250.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E. & Havarstein, L. S. (2005).** Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol* **187**, 4338-4345.
- Kilian, M., Reinholdt, J., Nyvad, B., Frandsen, E. V. & Mikkelsen, L. (1989).** IgA1 proteases of oral streptococci: ecological aspects. *Immunological investigations* **18**, 161-170.
- Klaenhammer, T. R. (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349.
- Klein, D. L. (1999).** Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. *Microb Drug Resist* **5**, 147-157.
- Knutsen, E., Ween, O. & Havarstein, L. S. (2004).** Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**, 3078-3085.
- Kochanowski, B., Fischer, W., Iida-Tanaka, N. & Ishizuka, I. (1993).** Isomaltoligosaccharide-containing lipoteichoic acid of *Streptococcus sanguis*. Basic structure. *Eur J Biochem* **214**, 747-755.
- Kotake, Y., Ishii, S., Yano, T., Katsuoka, Y. & Hayashi, H. (2008).** Substrate Recognition Mechanism of the Peptidase Domain of the Quorum-Sensing-Signal-Producing ABC Transporter ComA from *Streptococcus*. *Biochemistry* **47**, 2531-2538.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. & Qi, F. (2005a).** Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol Microbiol* **57**, 392-404.
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W. & Qi, F. (2005b).** Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* **187**, 7193-7203.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J. & De Vos, W. M. (1993).** Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the nisA and nisI genes for development of immunity. *Eur J Biochem* **216**, 281-291.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., de Ruyter, P. G., Luesink, E. J. & de Vos, W. M. (1995).** Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* **270**, 27299-27304.



**Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. (1960).** A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* **39**, 508-518.

**Lacks, S. A. & Greenberg, B. (2001).** Constitutive competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* caused by mutation of a transmembrane histidine kinase. *Mol Microbiol* **42**, 1035-1045.

**Lancefield, R. C. (1933).** A Serological Differentiation Of Human And Other Groups Of Hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **57**, 571-595.

**Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A. & other authors (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **237**, 223-234.

**Langley, K. E., Villarejo, M. R., Fowler, A. V., Zamenhof, P. J. & Zabin, I. (1975).** Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1254-1257.

**Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I. & Winkler, M. E. (2007).** Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**, 38-51.

**Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H. & Yalovsky, S. (2002).** A cell-specific, prenylation-independent mechanism regulates targeting of type II RACs. *Plant Cell* **14**, 2431-2450.

**LeBlanc, D. J., Lee, L. N. & Inamine, J. M. (1991).** Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 1804-1810.

**Lee, M. S., Seok, C. & Morrison, D. A. (1998).** Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4796-4802.

**Lee, M. S. & Morrison, D. A. (1999).** Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J Bacteriol* **181**, 5004-5016.

**LePecq, J. B. & Paoletti, C. (1967).** A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol* **27**, 87-106.

**Lock, R. A., Paton, J. C. & Hansman, D. (1988a).** Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **5**, 461-467.

**Lock, R. A., Paton, J. C. & Hansman, D. (1988b).** Purification and immunological characterization of neuraminidase produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **4**, 33-43.

- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. & Reichmann, P. (2007).** Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**, 7741-7751.
- Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B. & Poolman, B. (1997).** Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem* **272**, 14277-14284.
- Marinkovic, D. V., Marinkovic, J. N. & Tang, J. (1975).** Fragments of beta-galactosidase from *Escherichia coli*. Fragmentation, purification, characterization and in vitro complementation. *Preparative biochemistry* **5**, 257-280.
- Marshall, P. A., Loeb, G. I., Cowan, M. M. & Fletcher, M. (1989).** Response of microbial adhesives and biofilm matrix polymers to chemical treatments as determined by interference reflection microscopy and light section microscopy. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2827-2831.
- Matsumoto-Nakano, M. & Kuramitsu, H. K. (2006).** The role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*.
- McCullers, J. A. & Tuomanen, E. I. (2001).** Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci* **6**, D877-889.
- McDaniel, L. S., Sheffield, J. S., Delucchi, P. & Briles, D. E. (1991).** PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun* **59**, 222-228.
- McGee, L., McDougal, L., Zhou, J. & other authors (2001).** Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* **39**, 2565-2571.
- Mejean, V., Claverys, J. P., Vasseghi, H. & Sicard, A. M. (1981).** Rapid cloning of specific DNA fragments of *Streptococcus pneumoniae* by vector integration into the chromosome followed by endonucleolytic excision. *Gene* **15**, 289-293.
- Miller, K. W., Schamber, R., Osmanagaoglu, O. & Ray, B. (1998).** Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1997-2005.
- Mindich, L. (1966).** Bacteriocins of *Diplococcus pneumoniae*. I. Antagonistic relationships and genetic transformations. *J Bacteriol* **92**, 1090-1098.
- Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (1996).** Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *J Bacteriol* **178**, 600-605.
- Moll, G., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N. & Driessen, A. J. (1998).** Mechanistic properties of the two-component bacteriocin lactococcin G. *J Bacteriol* **180**, 96-99.
- Morrison, D. A., Trombe, M. C., Hayden, M. K., Waszak, G. A. & Chen, J. D. (1984).** Isolation of transformation-deficient *Streptococcus pneumoniae* mutants defective in control

of competence, using insertion-duplication mutagenesis with the erythromycin resistance determinant of pAM beta 1. *J Bacteriol* **159**, 870-876.

**Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C. & Lavoie, M. C. (2000).** MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 24-29.

**Mota-Meira, M., Morency, H. & Lavoie, M. C. (2005).** In vivo activity of mutacin B-Ny266. *J Antimicrob Chemother* **56**, 869-871.

**Mulholland, K. (1999).** Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* **17 Suppl 1**, S79-84.

**Muriana, P. M. & Klaenhammer, T. R. (1991a).** Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J Bacteriol* **173**, 1779-1788.

**Muriana, P. M. & Klaenhammer, T. R. (1991b).** Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl Environ Microbiol* **57**, 114-121.

**Musher, D. M. (1992).** Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* **14**, 801-807.

**Nealson, K. H. & Markovitz, A. (1970).** Mutant analysis and enzyme subunit complementation in bacterial bioluminescence in *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **104**, 300-312.

**Nealson, K. H. & Hastings, J. W. (1979).** Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**, 496-518.

**Nilsen, T., Nes, I. F. & Holo, H. (2003).** Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2975-2984.

**Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K. & Nes, I. F. (1992).** A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* **174**, 5686-5692.

**Nissen-Meyer, J., Havarstein, L. S., Holo, H., Sletten, K. & Nes, I. F. (1993).** Association of the lactococcal immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. *J Gen Microbiol* **139**, 1503-1509.

**O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr. & Kolter, R. (2000).** The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 425-431.

**Oggioni, M. R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., Andrew, P. W. & Pozzi, G. (2006).** Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol* **61**, 1196-1210.

- Ottolenghi, E. & Hotchkiss, R. D. (1962).** Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J Exp Med* **116**, 491-519.
- Parente, E. & Ricciardi, A. (1999).** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 628-638.
- Parker, R. M. & Barnes, N. M. (1999).** mRNA: detection by in Situ and northern hybridization. *Methods Mol Biol* **106**, 247-283.
- Paterson, G. K., Blue, C. E. & Mitchell, T. J. (2006).** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* **55**, 355-363.
- Pei, J. & Grishin, N. V. (2001).** Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends Biochem Sci* **26**, 275-277.
- Pestova, E. V., Havarstein, L. S. & Morrison, D. A. (1996).** Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**, 853-862.
- Peterson, S., Cline, R. T., Tettelin, H., Sharov, V. & Morrison, D. A. (2000).** Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* **182**, 6192-6202.
- Podbielski, A., Spellerberg, B., Woischnik, M., Pohl, B. & Lutticken, R. (1996).** Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). *Gene* **177**, 137-147.
- Pozzi, G., Masala, L., Iannelli, F., Manganelli, R., Havarstein, L. S., Piccoli, L., Simon, D. & Morrison, D. A. (1996).** Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol* **178**, 6087-6090.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. & Baumeister, K. (1987).** A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**, 336-341.
- Qi, F., Kreth, J., Levesque, C. M., Kay, O., Mair, R. W., Shi, W., Cvitkovitch, D. G. & Goodman, S. D. (2005).** Peptide pheromone induced cell death of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **251**, 321-326.
- Reichmann, P., Varon, E., Gunther, E., Reinert, R. R., Luttiken, R., Marton, A., Geslin, P., Wagner, J. & Hakenbeck, R. (1995).** Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Germany: genetic relationship to clones from other European countries. *J Med Microbiol* **43**, 377-385.
- Reichmann, P., Konig, A., Linares, J., Alcaide, F., Tenover, F. C., McDougal, L., Swidsinski, S. & Hakenbeck, R. (1997).** A global gene pool for high-level cephalosporin resistance in commensal *Streptococcus* species and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **176**, 1001-1012.

**Reichmann, P. & Hakenbeck, R. (2000).** Allelic variation in a peptide-inducible two-component system of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **190**, 231-236.

**Reinicke, A. T., Hutchinson, J. L., Magee, A. I., Mastroeni, P., Trowsdale, J. & Kelly, A. P. (2005).** A *Salmonella typhimurium* effector protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery. *J Biol Chem* **280**, 14620-14627.

**Riley, M. A. & Wertz, J. E. (2002).** Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* **56**, 117-137.

**Rimini, R., Jansson, B., Feger, G. & other authors (2000).** Global analysis of transcription kinetics during competence development in *Streptococcus pneumoniae* using high density DNA arrays. *Mol Microbiol* **36**, 1279-1292.

**Risoen, P. A., Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. & Nes, I. F. (2000).** Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Mol Microbiol* **37**, 619-628.

**Ross, R. P., Galvin, M., McAuliffe, O., Morgan, S. M., Ryan, M. P., Twomey, D. P., Meaney, W. J. & Hill, C. (1999).** Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 337-346.

**Saccomanno, C. F., Bordonaro, M., Chen, J. S. & Nordstrom, J. L. (1992).** A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques* **13**, 846-850.

**Sampson, J. S., O'Connor, S. P., Stinson, A. R., Tharpe, J. A. & Russell, H. (1994).** Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect Immun* **62**, 319-324.

**Sanchez-Beato, A. R., Garcia, E., Lopez, R. & Garcia, J. L. (1997).** Identification and characterization of IS1381, a new insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **179**, 2459-2463.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

**Saris, P. E., Immonen, T., Reis, M. & Sahl, H. G. (1996).** Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 151-159.

**Schillinger, U. & Lucke, F. K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1901-1906.

**Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972).** Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**, 407-477.

**Sibold, C., Wang, J., Henrichsen, J. & Hakenbeck, R. (1992).** Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect Immun* **60**, 4119-4126.

**Sonnhammer, E. L., von Heijne, G. & Krogh, A. (1998).** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB* **6**, 175-182.

**Steinmoen, H., Knutsen, E. & Havarstein, L. S. (2002).** Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7681-7686.

**Steinmoen, H., Teigen, A. & Havarstein, L. S. (2003).** Competence-Induced Cells of *Streptococcus pneumoniae* Lyse Competence-Deficient Cells of the Same Strain during Cocultivation. *J Bacteriol* **185**, 7176-7183.

**Suhre, K. (2007).** Inference of gene function based on gene fusion events: the rosetta-stone method. *Methods Mol Biol* **396**, 31-41.

**Swenson, J. M., Clark, N. C., Sahm, D. F. & other authors (1995).** Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* **33**, 3019-3021.

**Tagg, J. R. & McGiven, A. R. (1971).** Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol* **21**, 943.

**Tagg, J. R., Dajani, A. S. & Wannamaker, L. W. (1976).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological reviews* **40**, 722-756.

**Tagg, J. R. & Bannister, L. V. (1979).** "Fingerprinting" beta-haemolytic streptococci by their production of and sensitivity to bacteriocine-like inhibitors. *J Med Microbiol* **12**, 397-411.

**Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T. & other authors (2001).** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**, 498-506.

**Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P. & other authors (2000).** A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**, 566-576.

**Trombe, M. C., Laneelle, G. & Sicard, A. M. (1984).** Characterization of a *Streptococcus pneumoniae* mutant with altered electric transmembrane potential. *J Bacteriol* **158**, 1109-1114.

**Trueblood, C. E., Boyartchuk, V. L., Picologlou, E. A., Rozema, D., Poulter, C. D. & Rine, J. (2000).** The CaaX proteases, Afc1p and Rcel1p, have overlapping but distinct substrate specificities. *Mol Cell Biol* **20**, 4381-4392.

**Trzcinski, K., Thompson, C. M. & Lipsitch, M. (2003).** Construction of otherwise isogenic serotype 6B, 7F, 14, and 19F capsular variants of *Streptococcus pneumoniae* strain TIGR4. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7364-7370.

**Upreti, G. C. & Hinsdill, R. D. (1975).** Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 139-145.

**Upton, M., Tagg, J. R., Wescombe, P. & Jenkinson, H. F. (2001).** Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *J Bacteriol* **183**, 3931-3938.

**van Belkum, M. J. & Stiles, M. E. (1995).** Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3573-3579.

**van der Ploeg, J. R. (2005).** Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *J Bacteriol* **187**, 3980-3989.

**Vaughan, E. E., Daly, C. & Fitzgerald, G. F. (1992).** Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J Appl Bacteriol* **73**, 299-308.

**Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N. & Venema, G. (1993).** Mode of Action of Lactococcin B, a Thiol-Activated Bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1041-1048.

**Venema, K., Haverkort, R. E., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., de Leij, L., Venema, G. & Kok, J. (1994).** Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol Microbiol* **14**, 521-532.

**Wang, P. L. (2000).** Creating hybrid genes by homologous recombination. *Dis Markers* **16**, 3-13.

**Wang, Y., Henz, M. E., Gallagher, N. L., Chai, S., Gibbs, A. C., Yan, L. Z., Stiles, M. E., Wishart, D. S. & Vederas, J. C. (1999).** Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **38**, 15438-15447.

**Ween, O., Gaustad, P. & Havarstein, L. S. (1999).** Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **33**, 817-827.

**Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A. & other authors (2007).** The complete genome sequence of the lactic acid bacterial paradigm *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *J Bacteriol*.

**Weis, J. H., Tan, S. S., Martin, B. K. & Wittwer, C. T. (1992).** Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* **8**, 263-264.

**Whatmore, A. M., Barcus, V. A. & Dowson, C. G. (1999).** Genetic diversity of the streptococcal competence (com) gene locus. *J Bacteriol* **181**, 3144-3154.

**Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A. & other authors (2006).** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **34**, D173-180.

**Wright, L. P. & Philips, M. R. (2006).** Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* **47**, 883-891.

**Wunsch, P., Herb, M., Wieland, H., Schiek, U. M. & Zumft, W. G. (2003).** Requirements for Cu(A) and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **185**, 887-896.

**Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

**Yarmus, M., Mett, A. & Shapira, R. (2000).** Cloning and expression of the genes involved in the production of and immunity against the bacteriocin lacticin RM. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 279-290.

**Zähner, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Meral, M. & Hakenbeck, R. (2002).** The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **4**, 211-216.

**Zhang, F. L. & Casey, P. J. (1996).** Influence of metal ions on substrate binding and catalytic activity of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *The Biochemical journal* **320** ( Pt 3), 925-932.

**Zhou, L., Hui, F. M. & Morrison, D. A. (1995).** Characterization of IS1167, a new insertion sequence in *Streptococcus pneumoniae*. *Plasmid* **33**, 127-138.



## **Anhang**

## A. Nukleotidsequenz-Alignments

### A1 *S. pneumoniae* 628 gegen *S. pneumoniae* TIGR4

Alignment der Nukleotidsequenz von *S. pneumoniae* 628 gegen *S. pneumoniae* TIGR4. Gleiche Nukleotide sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet, nichtvorhandene durch einen Bindestrich (-) und Unterschiede sind fett hervorgehoben.

```

1                                                                 120
628
TIGR4  ACTTGGTCTT GACTTGGTCA AAGTGAAGC GGTCAATAGGC CCGCCAAGCG GCGCGAGTTG GAGCATCTGG ATCAAGAGCG CTGAGTCCCA TGAGAAGACT GGAAGTCTGG TAAAAATTTT

121                                                                 240
628
TIGR4  CTAGTTCAAT CAAGAATCGA TTATCCACTG TTTCAGCCTT GGCTAGAAAA CCAAGAATAG AGTTTAATTG CTCCTGAAAG CGGACGTCGT CAGCGCTTGC CTGTTTGTCAT GCTTGGTAGG

241                                                                 360
628
TIGR4  CTTTGTTTAA GTCAGTAATC AAAGTATGAG CTCTTTTGAT GGGGTCTGTA TCTGTCATGG GAATGCCTCC TTTAATCTGG GTGCCAGTCT TACTTCTGGC AACTGTGTTT TGATACTGTT

361                                                                 480
628
TIGR4  AGTTTATCAC TTTTAATTCT TTTTTTTTAT TCAAATCTTT AATTGTCATT GAAATGTCTT GAATTGCGCT GAGTGAATTT TATGATAAAA TAGTTGTAAG CTCATCATGA TGTGTGTAGAA

481                                                                 600
628
TIGR4  AATAATCCTT TTAGGAGTTT TCAAAGACTG TTTAGGATTG GGTGTGCTTG GGCTAGACCT TTTCTGTTAT TCTTTTCTTA GGAGGAGAAT CCAATGAAAT ATATGATTAT TCAGACGCAG

601                                                                 720
628
TIGR4  AAAACAGTCT ATAAAGTAAA CATCGACGAT ATCTACTATA TCCAAACACA TCCAATAAAA GCCCATAACG TACAGATTGT TACAGAAGAA GCTAGTTTTA ATATGCTTCA AAATTTAAGT

721                                                                 840
628
TIGR4  AATCTTGAGA ACCAATGTGG GGAAACCTTG ATGAGATGTC ATCGAAATTG TTTGGTTAAT CTTGATAAAT TAAAATCGAT TGATTTTCAA GAAAGAATCC TTTTCTCGG AGAAGAAGGT

841                                                                 960
628
TIGR4  CAATACGCTG TCAAGTATGC CAGACGTCGC TATAGAGAAA TTCGTCAAAA ATGGTTGAAA GAGGGAGAGT AAGAAGATGA GAATATTTGT TTTAGAGGAT GATTTTTCCT AACAGACTAG

961                                                                 1080
628
TIGR4  AATTGAAACG ACGATTGAGA AACTTTTGAA AGCACATCAT ATCATTCCTA GCTCTTTTGA GGTATTTGGC AAGCCGGACC AACTGCTGGC TGAAGTGCAT GAGAAGGGGG CCCATCAGCT

1081                                                                1200
628
TIGR4  ATTCTTTTGG GATATTGAGA TTCGAAATGA AGAGATGAAG GGAAGTGAAG TGGCTAGAAA GATTTCGGGAT CGGGATCCTT ATGCCCTGAT TGTCTTTGTG ACGACTCACT CGGAGTTTAT
```

	1201		1320
628	GCCCCTGTCT TTTGCTACC AAGTGTCTGC TTTGGACTAC ATTGATAAGG CCTTGTGAGC AGAGGAGTTT GAATCTCGGA TCGAGACAGC CCTCCTCTAT GCCAATAGTC AAGATAGTAA		
TIGR4	.....		
	1321		1440
628	AAGTCTGGCG GAAGATTGCT TTTACTTTAA ATCAAAATTT GCCCAATTTT AGTATCCTTT TAAAGAGGTT TACTATCTCG AAACGTCGCC CAGAGCCCAT CGTGTATTTC TCTATACCAA		
TIGR4	.....		
	1441		1560
628	GACAGACAGG CTGGAATTTA CAGCGAGTTT AGAGGAGGTT TTCAAGCAGG AGCCCCGTCT CTTGCAGTGC CACCGCTCTT TTCTCATCAA TCCTGCAAAT GTGGTGCATT TGGATAAGAA		
TIGR4	.....		
	1561		1680
628	AGAAAACTG CTTTTCTTTC CCAATGGTGG AAGTTGTCTA ATCGCCCGTT ATAAGGTCAG GGAAGTGTCT GAGGCCATCA ATAAATTACA CTGAGCTAGG AGAATTTATG AACATTGCTT		
TIGR4	.....		
	1681		1800
628	GGATATTGTT GTATACACTT GTTACTAATG GACTAGAAAT TGTACATCTT TTTAAGGTGG ATGGAATTGA TCTTACTTTC GAGAGGATTT TTAAGGCCTT TCTTTTGAAG ATACTGTTGG		
TIGR4	.....		
	1801		1920
628	CCTTTGTTTT TGTGATGATT AGCTATATAG TAGGAAATGT TTACCTATCT TATTTTATGG AACCCCTTGA CGGCATAGGC TTATCTTTCT TATTATTGAG AGGGCTTCCT AAAAACTCC		
TIGR4	.....		
	1921		2040
628	TTTTCTTTTA TGGTCTCTTT CCAATGATAT TGGTGAATCT CTTTTATAGA GGAGTCTCCT ATTTTGTGCT TCCATTTTGG GGACAAGGGC AAGTATATGA TGGCTACTCA TTTACTGGGT		
TIGR4	.....		
	2041		2160
628	TATGTATAAT AATTTTCAAT TTCTTCATTT CTCTAGCTTT TTTGAAATGG TTGGACTACG ATTTTACTAG CTTGAGAAAG GAGATTCTCG ATAAAGCCTT TCAAAAGTCC CTGACTCAGA		
TIGR4	.....		
	2161		2280
628	TTAACTGGAT AATGGGTGGC TACTATCTAG TCATGGAAG TCTGTCTTTT TTTGAATATG AACAAAGTAT TCAATCAAAG ACTGTTTCGCC ATCTCATCCT AGTCTTTTAC CTACTCTTTT		
TIGR4	.....		
	2281		2400
628	TTATGGGGGT TATCAAGAAA TTGGATACCT ATTTGAAGGA AAACTCTAT GAGAGATTGG AACAAAGACA GGCCCTGCGC TATAGAGATA TGGAACGCTA TAGTCGGCAT ATAGAGGAGC		
TIGR4	.....		
	2401		2520
628	TTTACAAGGA AGTACGGAGC TTTCGTCATG ATTATACCAA CCTCTTGACT AGCTTACGTC TGGGCATTGA AGAGGAGGAT ATGGAGCAGA TAAAAGAGGT CTATGGCTCC GTCTTAAAGG		
TIGR4	.....		
	2521		2640
628	ATTCCAGTCA GAAATTGCAG AACAAATAAT ATGACCTGGG CAGATTGGTA AATATTCGTG ATAAAGCCCT CAAAAGTCTT CTAGCAGGGA AATTTTAAAG AGCCAGAGAT AAGAACATTG		
TIGR4	.....		

	2641												2760
628	TCTTTAATGT	CGAAGTTCCT	GAGGAGATTC	AGGTCGAGGG	GATGAGTCTA	CTTGATTTTC	TAACCATTGT	GTCTATCCTT	TGTGACAATG	CTATTGAAGC	CAGTGTGGAA	GCTAGTCAAC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	2761												2880
628	CTCATGTTTC	AATCGCCTTT	TTAAAAAATG	GAGCACAGGA	GACCTTTATC	ATCGAAAACT	CCATCAAAGA	AGAGGGCATC	GATATTTCTG	AAATCTTCTC	CTTTGGAGCC	AGTTCTAAAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	2881												3000
628	GGGAGGAGAG	AGGAGTTGGT	CTCTATACCG	TCATGAAGAT	TGTGGAAAGC	CATCCTAATA	CCAGTCTAAA	TACCACCTGT	CAAAATCAAG	TCTTTCGTCA	GGTACTTACT	GTGATACATA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3001												3120
628	CAGAATGATG	AAAAATAAGA	CCGAGAGTAC	TGTTTTCTCG	GTCTTATTTT	TTTATAGTTG	TATTGGATGA	TGAAGTCTT	ATGTGATGTA	ATGAGCATAT	CTATTAATGT	TATATAATAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3121												3240
628	ATCTTCCAC	AATCCTCCAC	CTGTAATTG	ATTGAGTTCG	GTAGTTGTTA	GTTCTTGAAA	TGAAGTTAGG	TTTGTTTCT	TATCCATGTT	ATGATTCTCC	TTTTTGATAA	GATAATAAAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3241												3360
628	AGTTATAGAG	TGTATCTGA	AAATTAATCA	GAATGTGTTA	AAATTTTATC	TTTGAAATAA	TCAAAATATG	TTTTCTTGT	AGTTACACTA	GTGACGCGAC	CTTGTAAGCC	ATATTGGATG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3361												3480
628	AGTTTACTAT	CCTCGTTAGA	TAGTTTTGCA	AGAGCGGTTA	ATTTAAAGAG	ATTCCTTGC	TCTGTTCTGG	TAGGAGTTTG	ATCAATTGTC	TGAAGTTGGC	CGATGATGGT	GGTGCCGTGA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3481												3600
628	TTTCCAATCT	TCTCCAGTTT	TAATCTTACA	GTTTGTCTT	TATCTAGTAG	AGGTAGATAG	TCAGAAGATA	CGTAGTAAGT	GATTAGTACT	TCTCTGTAT	CTGTGATGAC	AGGGAATATT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3601												3720
628	TGAGCAATTT	CTGTACCAGT	TGGAATTCTA	TTTTTACCTT	CAAATTCGCT	GTTCAGATGA	ACGATACCTT	TACTTGGGGA	GGTTAAGGTA	TTGTTTTCCA	AACGCTGTGT	GGCTTGATCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3721												3840
628	AGTTGTACTT	TTAATTCTGT	TAATTGATTC	TCCACAGTTA	GTTGTTGCTG	TGAGGCTGTC	TGTAAAAACT	GAGTGCGGAG	TACTTCAATT	TTGGTTGCTA	AACTGTTATC	ATAAGTTGCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3841												3960
628	ACACTTCCGA	TACCAGCTTG	CTGAATTTTG	AGGCTTGCGA	TAGATGATTC	AAGACCTGCA	ATACTTTGAT	TAATTTGAGA	TAAAAATGGC	TCCTCTGCAG	TTCTTGTGT	TTGTCCTTGT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3961												4080
628	GAGGCTACAA	GATAACGATT	CAAATTGAC	TGGTGCGGAT	TGCCAGTTGG	TAAGCGTGCT	CTGTTATTTA	TGATAGCATC	TCTCAACTCT	TGATATTCTC	CAATTTGTTG	TTGAACTTTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

	4081												4200
628	GTAATTTCTT	GTTCAATAGC	TGATGAACTG	CTATTGGAAA	GATTAGCTTG	ATTTGAAACT	TCGGTGTTAG	TCTTTGTGAT	ACCCAGTTCA	ATATCATGGG	ATTGTTTAGT	AAAATTCATA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4201												4320
628	AAGGTATTAT	GGTAGCCAAA	TTCATCCTCG	CCAGAAAAAA	GATCAGTCGC	TTTTTCTAAG	CTTTGTTTCA	AAATTCCAAG	TCCTTCTTTT	TGCTTCTCAA	GTCTTTGTAA	TTGAGTTGCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4321												4440
628	AAGGCAGTTT	TCTGACTTTC	TTCCATTGTT	TCAGAGTATT	TGATGAGTAA	GTCCCCTTTT	TCAACTACTT	GATTTGCCAC	TAAATGATTA	GCTAGGATAG	GATTATCACT	GGTTGACTGA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4441												4560
628	ATGGAGGCAA	TGACACTTGT	AGGGGCGATT	TCTCCTTGGG	AAGTAACAGT	AATTTCTTTT	GTGGCAACAA	GGGAGAAAAA	CAAGATGAAA	GTAAATAGTA	ATGAAAGAGG	TATAATTAAC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4561												4680
628	ACTGTGCGAT	AGTTATGGTA	ACGTCTCTGA	TAAAACTCGA	CGCTTCTAAA	AAGATTAGGA	TTCATGACAT	TCTCCTTATT	TATTGAATAG	ATGATGGTAG	AAACCTTGCG	CCTGCATTAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4681												4800
628	CTCTTGGTGA	CTACCAACTT	CAATGATTTT	CCCCTGGTCA	AGAACAATGA	CACGGTTGGT	TCGTTCGGCT	ATACTGAGAC	GATGGGCTAC	AAAGAGAATG	GTTTATCAG	TTAGAGACAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4801												4920
628	AAGATTATCT	ATAACCTTTT	TCTCAGTCAA	GACATCAAGA	CCGCTAGTAG	CTTCATCTAG	TATTAAAACA	GGAGATTTAG	TTAAAAGAGC	ACGAGCGAGA	GCGATTCGTT	GCTTCTGTCC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4921												5040
628	TCCTGATAGA	CCAGCTCCAT	CAGAGAGCTG	AGTTTGATAG	CCCATAGGCA	TTCTTTCAAT	GTCTTGACGG	ATTCAGCTA	CTTCACAAGC	TTTGAATA	TCTTCTTGAC	TAATCATATG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5041												5160
628	ATTACGCCC	AAGGTTAAGT	TTTCCAAAAT	AGAGCCATTA	AAGATATAGG	CTTGTGGGG	TAGGTAATTA	ATATGACGGC	GCAAGACTTT	TTTATCAATG	TTTTTAATAT	CCTGATGATT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5161												5280
628	GATGAAATA	TGCCCTTTGT	AGGGTTCAAA	GAAATTGACA	ATCATTTTGG	CTAAAGTTGT	TTTACCAGAA	CCACTAACTC	CAACTAGGCT	AACCTTATCT	CCTTGTTTAA	TCGTGAGATT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5281												5400
628	AATATCTGTT	AAGGTATCTC	ATCCAAAACC	ATACTTATAA	GAAAGGTCAT	CAAATTCAAT	ATCGCCCATC	AAAAAATGTG	AATGAACAGG	GTTTTCTTGA	ACTTGAAATT	CAGATTTCGAC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5401												5520
628	TAGATAGACT	TCGTTCAAAC	GGTTATTAGC	GACCTTCGCA	GATTGGAGTT	TGGTTTGGAG	GTTGATAATA	TTTTCCATAG	GAGTTGTAAA	GTAAGAAAAA	AGTGTGTTAA	AGGTAATCAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

	5521												5640
628	CTGACCGATA	GAAATTTTAC	TTGACATGAC	TAATTGAGCG	CCAAACCATA	GGATAAGGAT	ATTCAGAACT	AATTTTGTTC	CCTGCTTTAA	ACTCGTTTGT	AAAATAGAAT	ATTTACTGAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5641												5760
628	CTTAAAGGAT	TTTTCCAAAT	AATCTACAAA	TTGCTGTCT	ATATTTTGAT	AGCGATTTTC	TCTACTCGTG	AGCGACTTTA	TAGTTTCAAT	CCCGTTGATA	TCTTCGATAA	TGGCAGAGCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5761												5880
628	AACCATAGAA	TTACTTTGCA	TGACATCATG	GTTCAATTTT	TCGAAAGGTT	TCATAAAAGA	AAAGATGATG	AACATGTATA	TAGGAATGGA	AATAAGAGAA	AGAAGGAAGA	GATTAGGGTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5881												6000
628	TTGTGCCAGT	AAGACGCCTC	CTACAAGAAT	CAGAATAGAA	ACATCCAGAA	AAAGAGAAAAG	AATGGTAGAA	GCCAAGGCAT	CTATAATAGA	GTTAGCATCT	GTGAATCGTG	AAATGATTTC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6001												6120
628	TCCTGTACGA	CGTGTCGCAA	AGAAAGACAT	GGGAAGTTCA	AAAATATGGC	GAATATAGGA	TAAAATCACA	TCAATACTTA	ATCTCTGACT	CAGAACGGTT	AGGAGATAAT	CTCTGGAGAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6121												6240
628	GCTCATGACT	TGTGAGGA	TATAGGTGAT	AACCAGACCA	ACTGAGATGA	TTCTTAAAGT	TGATTTTCATC	TGATTTGGAA	TGTATTCATC	CAAGATTCCT	TGGAGATAGT	AAGAACCACC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6241												6360
628	TATATTGATA	ATAGTGACCA	ATAAGCTTGA	GAGAACAAATG	TAAGCAATGA	GAGATTTTTG	TTTGAAAATC	AGAGGAAGGA	AGCTTGCTTA	GTAGACCATT	CTTTTTATCT	TTATGGGGTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6361												6480
628	GATAGCTGGG	TTTGGTAGCT	AGAAAAATAG	CTACTCCAGT	CCATTCATAG	AAAAAGCGTT	CTTTTGACAT	TTTAGTGATT	TTTACAGAAG	GGTCAGGATC	ACCAATAATC	AGATAGTCTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6481												6600
628	TCTTTGTTTG	ATAGACAACA	TAGTAATGTT	GGAGTTTTC	TTCTTTGTTA	ACGTGAACGA	TAAATGGATA	GGGACATCA	CTCATGTCAA	AGAGCGTTTT	ATCTGCTTGA	ACAGGTCTTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6601												6720
628	TTTCAAAGCC	CATTTTCATCA	GCGGCTTTTA	CAATGCCAAG	AGCAGTCGTC	CCTTCTTTAT	TGGTCTTTGC	AAGTTCTCTC	AAGTGAGCTA	GAGAAAAATC	TGAACCATAG	AATTTAGCAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6721												6840
628	TCGAGGCTAA	GGCAGCGACA	CCACAGTCTC	TCGCATCTAT	TTGAGGAACA	AATGTACGTT	TATAAGAAGT	CATTGGCAAT	TCCTTTCATA	TAGTGGATAG	GTCTATTATG	TCATAAACT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6841												6960
628	AAGTTCATAT	TTTATGAAAT	CTTGAATAGT	CATTAAAACT	TCCTGAATGG	TAAAAAAGTG	ATTAGAAATT	ATTTTTTTTA	AACATTTAGA	GGTGGCTTGA	AATAAAAAAG	CTAATTCAAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

	6961												7080
628	ACGTTTCGAT	GACAATTCAA	GATCTGGATG	AAAAATTTTA	AAAAACGATG	ATATACTAAA	CTTATCAAAG	TTACAACAAG	ACAAAAATAA	AAAAAGAAAA	AAGGAGTATT	TGTCATGAAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7081												7200
628	ACAAAAATGA	TGGAACAATT	TTCTGTTATG	GATAATGAAG	AACTCGAAAT	AGTTAGTGGA	GGAAGAGGCA	ATTTAGGATC	TGCAATCGGT	GGTTGTATTG	GAGCAGTACT	ATTAGCTGCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7201												7320
628	GCGACTGGTC	CGATAACTGG	GGGAGCAGCA	ACACTTATTT	GTGTAGGTTC	AGGAATTATG	TCCTCTTTGT	AAGATTATGA	TTCTTAAATA	TAGTATTATT	ATCGCTATTA	ATTTACTGTC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7321												7440
628	TTATTTACTT	ACTTACAAAA	TATCAAAGTT	ATCTAAGAAT	GATGAGAATA	AGATAGTTAG	CAAAATTTTA	ATTATATTAT	CAATCGTTTA	TGTAATCGTT	GATGCTTTAC	TTAGTTGATG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7441												7560
628	GATTGGTAGG	AATAAAAAAC	TTAACTATAA	ACTATTATTT	ACTAATATTT	TTTGCTTTCT	GCAAGTTAAT	AAATAGTATA	GTAAAACTTT	TTATTGCAAG	GAGAATAACG	AAATTAAGAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7561												7680
628	ATTTTAGATA	CTCAAGATTA	TTGAAATCTT	AGACTAAAAA	ATAGGTACTG	CTACCTTTAA	GAAGATAGTA	GACGTGTATA	CTTTTTTAAG	AAAATCAAAA	AGATACTATA	AAAAATCTAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... <b>A</b> .....	.....	.....	.....	.....	
	7681												7800
628	TTGTTTATTG	AATTTAAGAC	TTTGGTAACA	AATTGAAAAT	AAAAAGGAGG	TATTCATCAT	GAATACAAAA	ATGTTGTCAC	AGTTAGAGGT	TATGGATACT	GAAATGCTTG	CGAAAGTTGA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7801												7920
628	AGGGGGGTAT	AGCTCCACTG	ATTGTCAAAA	TGCACTGATT	ACAGGAGTCA	CTACGGGAAT	TATAACTGGT	GGAAC TGAG	CAGGTTTGGC	CACTTTAGGA	GTAGCTGGAC	TTGCTGGTGC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	7921												8040
628	ATTTGTTGGA	GCACACATTG	GTGCAATTGG	GGGTGGATTA	ACATGCTTAG	GAGGTATGGT	TGGTGATAAA	TTGGGACTAA	GTTGGTAAGA	CTTATAGTAA	AATTATGAGG	ATTCTATTCT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8041												8160
628	GATTTATTTT	AGTTTTTTTAA	AAAAGGAGTA	TTTGT CATGG	ATACAAAAAT	GATGTCACAA	TTTTCTGTTA	TGGATACTGA	AATGCTTGCT	TGCGTTGAAG	GTGGCGGATG	CAATTGGGGA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8161												8280
628	GATTTTGCCA	AAGCAGGTGT	TGGAGGAGCA	GCAGCAAGAG	GTCTTCAACT	AGGCATTAAA	ACAGGAACAT	GGCAAGGTGC	AGCAACTGGT	GCTGCGGGTG	GAGCTATACT	TGGAGGTGTA	
TIGR4	.....	.....	..... <b>G</b> .....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8281												8400
628	GCCTATGCAG	CAACATGTTG	GTGGTAATTA	TGGATTTTAA	AAGTTTTTATT	ATTGGTTTAG	TAGTTGGTAT	ATTTGGTCCT	TATATGGATA	ATTTAATTAG	AAAAATATTT	TCAAAATCTC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..... <b>G</b> ..... <b>C</b> .....	.....	.....	.....	

	8401												8520
628	CCAAAAAGGA	TACAGATAGT	ACCCCCTAAA	AAATAAAATT	TCTCCCCTGT	ATTTGCTAGC	TTAATTTACA	GGGGAGTTTC	CTTAATATGG	TTTCGCCTGT	CAAAATGATA	TGTGATAGCA	
TIGR4	.....	...G.....	..T.T.....	.....-..	.....	.....	.....	.....	T.....T.	.....	.....	.....	
	8521												8640
628	GGATGAAAAAG	TCTACAAACA	AGTTGGTATC	AATACAATAT	AAAGAGGAAA	GTATGTTTTT	CATGCTTGCT	TTTTTAATTT	TTACAATTCA	AGAGGTTTTG	ATGACCATT	ATGATTGAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8641												8760
628	TGATCCAAGG	TCAAAATAAG	TGCTATACTA	GCAGTGTAAG	TGTTCTTGCT	CAACTAAGAT	AAATCGCACA	TTAGGAGGA	AATCTTATGA	AGAAAAAAT	ACTGATTATT	TTCGTTCTGT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8761												8880
628	ATCTAATCAT	GTCCATCTTT	CTATATCCGC	TTAGGGAGAG	TGCTTGCTAT	CAGCTATTTT	ATACCATAGC	CTATGTGATT	GCAGTTATGA	TCTATTTTGC	TATCAATAAA	AAGAAAGGAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	8881												9000
628	AAAAGAAATG	AAAACCTTTT	TTGCTAAAAA	ACGGAACATC	TTCCTTGCGA	GATTGTTCTT	AGGTCAGTTG	CCCTTGCTTG	TTTCTACTTA	TCTATTTCTA	TCTCGTCAGT	TTTTAAATTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9001												9120
628	TTCCGTAGTT	TTCCAATTTT	TTTGTAGTAG	TATTAAGTTG	GCTTCTATTT	TGGTTACTGT	TTATCTCACT	AGGGAAATGA	GGATAAGAGA	GTTTGAAGAT	GATGATTGG	TTAGTCCTAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9121												9240
628	AACCAATCAA	CTTATGTTCA	TCGGCTTGAC	AGGTTTTATG	TCTATTATTT	GTTTGTATAG	AGGTATCACA	GCAGGAGAAT	CCTACCAACA	AATAATCGCT	TATATTGGCG	CTGTTCTCTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9241												9360
628	CTTAATCATC	ATGCTTCTGC	TCATGTGGGG	CTTGAAGTAT	TATAAAAAGT	AGAGCTTAAT	GAAGTATAAA	AGAAAAGGGT	AAGTGTTTTT	GCAATACTTA	CCCTTTTATA	ATAGATTCCC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9361												9480
628	TGCGAAACAA	AATATGGTAT	AGTATAGTAG	ATTGAAACTA	GAATAGTACG	CCTCTACTTC	TAAAACATTG	TTAGAAATCG	ATTTGACTGT	CCTGATCGAT	TTATCCTGTT	CTTATTTTCAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9481												9600
628	TTTACTATAG	TTCTATGAAT	TATGAAGCAA	GTAAACAAC	AACTGATGCA	CGATTTAAGC	GTCTTGTTGG	TGTTTCAGCGC	ACGACTTTTG	AAGAGATGCT	AGCTGTATTA	AAAACAGCTT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9601												9720
628	ATCAACTTAA	ACACGCAAAA	GGTGGACGAA	AACCTAAATT	AAGCCTAGAA	GACCTTCTTA	TGGCCACTCT	TCAATATGTG	CGAGAATACC	GCACTTATGA	AGAAATTGCG	GCTGATTTTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9721												9840
628	GTGTTACGA	AAGCAACTTA	CTCCGTCGGA	GCCAATGGGT	TGAAGTAACT	CTTGTTCAAA	GTGGTGTTAC	GATTTCAAGA	ACTCCTCTCA	GTTCTGAGGA	CACGGTAATG	ATTGATGCGA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	



	9841												9960
628	CGGAAGTAAA	AATCAATCGC	CCTAAAAAAA	GAATTAGCGA	ATGATTCTGG	TAAAAAGAAA	TTTCACGCTA	TGAAGACTCA	AGCGATTGTC	ACAAGTCAAG	GGAGAATTGT	TTCTTTGGAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	9961												10080
628	ATCACTGTGA	ACTATTGTCA	TGATATGAAG	TTGTTCAAAA	TGAGTCGCAG	AAATATCGGA	CAAGCTGGTA	AAATCTTGGC	TGACAGTGGT	TATCAAGGGC	TCATGAAGAT	ATATCCTCAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10081												10200
628	GCACAAACTT	CACGTAAATC	CAGCAAACCTC	AAACCGCTAA	CAGTTGAAGA	TAAAGCCTGT	AACCATGCGC	TATCTAAGGA	GAGAAGCAAG	GTTGAGAACA	TCTTTGCCAA	AGTAAAAACG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10201												10320
628	TTTTAAATGT	TTTCAACAAC	CTATCGAAGT	CATCGTAAAC	GCTTCGGATT	ACGAATGAAT	TTGAGTGCTG	GTATTATCAA	TCATGAACTA	GGATTCTAGT	TTTGCAGGAA	GTCTAATGTA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10321												10440
628	ATTTTGTCAA	TTCAAGACGT	TTCGATGACT	ATTCAAAAATC	TGGATGAAAA	ATTTTAAAAA	ACGATGATAT	ACTAAACTTG	TCAAAGTTAC	AACAAGACAA	AAATTAAAAA	TAAAAAAGAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10441												10560
628	TATTTGTTCAT	GGATACAAAA	ATTATGGAAC	AATTTTCATGA	AATGGATATA	ACTATGTTAT	CTAGTATTGA	AGGAGGCAAG	AATAATTGGC	AAACTAATGT	CTTAGAAGGT	GGTGGTGCTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10561												10680
628	CTTTTGGTGG	CTGGGGGCTA	GGGACAGCTA	TTTGTGCTGC	GAGTGGTGTT	GGAGCACCAT	TTATGGGAGC	ATGTGGATAC	ATAGGAGCTA	AATTTGGTGT	GGATCTTTTG	GCAGGAGTAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10681												10800
628	CAGGGGCAAC	GGGTGGATTT	TAATAAAAGG	AGACTTGTAT	GAATACTTAT	TGTAATATAA	ATGAAACAAT	GCTGAGTGAG	GTTTATGGAG	GTAATTCCGG	AGGAGCAGCT	GTAGTTGCTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10801												10920
628	CTTTAGGTTG	TGCAGCGGGT	GGAGTGAAAT	ATGGGAGACT	TCTAGGACCA	TGGGGCGCTG	CAATAGGAGG	AATTGGAGGA	GCAGTGGTTT	GTGGATATTT	AGCCTATACC	GCTACATCAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	10921												11040
628	AAAAATGAAA	GCTAAATTTT	ATGAAGGCTA	TATTCTTTAT	TATTCTCTTC	GCTTTTCAAA	CCTATCTTAT	TTATCTATCC	ATAAGTATCT	CCGATAAAAA	ACAAAAGACT	ATTGAATTAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	11041												11160
628	CATCATTGAA	TTGTTTTGTC	ATATTATTTT	TAATCTATGA	TAAATTAATT	TTTCTCTTTA	TTGCCTATGT	TTTTTTGATA	ATTTTTATAT	TAACTTGTT	CCGTAAGTGA	AAAGTGATAC	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	11161												11280
628	ACTATATGGA	TACAAAAATG	ATGTCACAAT	TTGCAGTTAT	GGATAATGAA	ATGCTTGCTT	GCGTTGAAGG	TGGAGATATT	GATTGGGGAA	GAAAAATTAG	TTGTGCAGCA	GGGGTTGCAT	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

	11281											11400
628	ATGGCGCAAT	TGATGGGTGT	GCAACAACGG	TTTGACATTT	CTATTGGGAC	CATTTGCTAT	AGGAATAGGT	GTAAC TGGTG	CTGCAGGTGG	AGCTATACTT	GGAGGTGTAG	CCTATGCAAGC
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	11401											11520
628	AATATGTTGG	TGGTAATTAT	GGATTTTAAA	AGTTTTATTA	TTGGTTTAGT	AGTTGGTATA	TTTGGTCCTT	ATATGGATGA	CTTAATTAGA	AAAATATTTT	CAAAATCTTC	CAAAAAGGAT
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	11521											11640
628	ACGATAGTA	CTCTCTAAAA	AATAAATTC	TCCCCTGTAT	TTGCTAGCTT	AATTTACAGG	GGAGTTTCTT	TAATATTGTT	TCGCCTGTCA	AAATGATATG	TGATAGCAGG	ATGAAAAGTC
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	11641											11760
628	TACAAACAAG	TTGGTATCAA	TACAATATAA	AGAGGAAAAGT	ATGTTTTTAA	TGCTTACTTT	TTAAATTTT	TAACAATTCA	AGATGTTTCG	ATGACAATTC	AAGATTTGGA	TGAAAAATTT
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	11761											11880
628	TAAAAAACA	TGATATACTA	AACTTGTC	AGTTGCAACG	GGTGCTGCTA	CATTATGTTA	AAAATCGCTC	TTGATTGATA	AGCTGGATTT	GTTAGGAAA	GAGTAAATAA	TTATGGATAA
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	11881											12000
628	GAAAAAGATA	GTTTCGACTA	TAATATGTAT	AGTATTCTT	GTAGTGTCAG	TAGATAATTT	TTTTAGAGAC	TTAACCCCGT	TACTGTTTCAT	TTTAAATATT	ATTGGCCTGT	CTTGCTTTTC
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12001											12120
628	AGTGCTAACA	TACATTAACA	TAAAAGAGAT	ACTCTTAAAT	ATAAGTAAAT	GATGATTTGG	TTAGTCCTAG	AACCAATCAA	CTTATGTTTA	TCGGCTTGGC	AGATTTTATG	TTTGTCATTT
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12121											12240
628	GTTTGTATAG	AGGTATTTCA	GAAACAGAAT	TCTATCAACA	ACTAATCGCT	TATATAGGTG	TATTCTCTGC	TTGTTTATCA	CGCTTCTGCT	CATGTGGGGC	TTGAAGTATT	ATAAAAAGTA
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12241											12360
628	GCTTTCTATC	CTTTTCTGAC	AGGATATTTG	AGTAGAAGGC	TCTATTAAAT	TGTTAGTGAA	ATAAATGAAT	GGAGGTATTT	AATATGAAAT	ACAGATTATT	TTTTGTTATT	TTCTTGAGTA
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12361											12480
628	GTGTGTTGGA	TATTCTTTTA	GGGACATTTT	TACAAATCTC	TATCGTATCT	ATTGGGTGGC	TTGTTCTTTA	CAGTGGTTTG	TTTGAAGCAG	GAGTTTTCCT	TCTTGCTAAT	AAAGGGGTGG
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Consensus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12481											12600
628	CGGTAAAAAT	CAAGGAAGTA	GATATTCGAA	ATCGCTTTAA	ATTTATTTTT	GGAAAAACCT	TATGGTTTCA	AATTCCTTTG	CTCATCTTTT	TGATAATCAA	ACTTTATCTT	GGTTTGATG
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	12601											12720
628	CGAGGTTGAT	TTTATTCTAT	GGACATATTT	TCATTGTCTT	TAATGCCTTA	ATGTATCTAT	TATCTAGTAG	TCAGGTTAGC	CTTAAAAAAA	ACAAACTGTC	TTCTTAATCT	TACAGCCAGT
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	12721												12840
628	AAAGCCTGAC	AAGGTGAGAT	CATAGTAGGG	AGGATTCTTA	TGAAAAAGTA	TCAACTTCTA	TTCAAAATAA	GTGCAGTCTT	CTCTTACTTA	TTTTTCGTAT	TTAGTCTTTC	TCAGCTGACG	
TIGR4	.G.....	.....G.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	12841												12960
628	CTTATCGTCC	AAAACTATTG	GCAATTTTCT	TCCCAGATAG	GCAATTTAGT	CTGGATTCAA	AATATCTTGA	GTTTACTATT	TAGCGGAGTC	ATGATTGGGA	TTCTGGTTAA	GACAGGCCAT	
TIGR4	.....	.....	.....	..T.....	.....T.	.....	.....	.....T..	..TT.....	.....T.G	....T....	.....	
	12961												13080
628	GGTTATCTCT	TCCGCATTCC	AAGAAAAAAA	TGGCTTTGGT	ATTTCGATTTT	GACAGTATTA	GTGCTAGTGC	TCCAGATCTC	TTTTAACGTT	CAGACAGCTA	AACATGTTCA	GTCAACTGCG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	
	13081												13200
628	GAAGGTTGGG	CTGTATTGAT	CGGTTATAGT	GGGACCAACT	TTGCAGAGCT	AGGTATCTAT	ATAACCCTGT	TCTTTCTGAC	TCCACTGATG	GAAGAACTAA	TCTATAGAGG	ATTACTGCAA	
TIGR4	.....	.....	T.....	....T....	.....	.....T...	...G.....	.....GT	.....	.....T.G.	.T.....	.....	
	13201												13320
628	CACGCCTTCT	TTAAGCATTG	GAGATTTGGC	CTTGATTGTC	TTCTTCCGTC	AATTTTATTT	GCTCTCCCTC	ATTTTCAAG	CCTGCCTAGT	CTGTTAGATA	TCTTCATCTT	TGCAACAGCT	
TIGR4	..T..T....	.....	.C.....T	.....	.....T..	T.....	.....	.....	.....	.....	.....G....	.....T.	
	13321												13440
628	GGAATCATCT	TTGCTAGTTT	GACCCGCTAT	ACCAAGAGCA	TTTATCCATC	CTATGCGGTG	CATGTGATCA	ATAATATTGT	AGCGACCTTC	CCGTTTTTGC	TCACTTTTCT	ACATAGGGTC	
TIGR4	.....	.....G....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	13441												13560
628	TTGGGGTAAA	AAAACAAAAG	GCTTGCTTTT	CAGCCATAGA	GGAGGTCATC	ATGTATAAAC	ACTTATTTT	CCTAGATTCC	AAAACTTTAG	ATCGGTTGAC	ACCCTATATT	CTAGTCTTGG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	13561												13680
628	CTTCTGACAC	CATTGCTTTT	AATGTTTTTG	TGCTAACCTT	TGTATCTGCG	GTGGTTTTTA	ATTTCCTAAA	TTCCATGCTA	GCTTTAATGG	CTATATTCAT	AGGGGCTGGC	TATGTGGTCG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	13681												13800
628	GATTTTGGTT	ACTAATACTC	AATGAAAATC	AAAGAGCAAA	CTAGGAAACT	AGCCGCAGGC	TGTACTTGAG	TACGGCAAGG	CGACGTTGAC	GTGGTTTGAA	TTTGATTTTC	GAAGAGTATA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	13801												13920
628	AAATGGTTTG	TTTTGGAAAG	GCTAGAACTA	AAGAATGACG	CGTAGGAAGT	CTGTTTGGTG	AGGAGGATAG	TTTTATGGAG	TTTTTTGATA	AATTCATGTC	CTTGTGTTTT	GGATTTTTAG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	T.....	.....T..	.....A	.....	.....	.....	.....	.....	
	13921												14040
628	TACTAATAAT	TGTCATTACA	GTCCTTATA	CGATTAACCA	TGGGGGTTTT	TTTCAAAATG	AATCTGCATT	GATTCTTGTA	AGTCTTCTTG	TAACCTCGCT	GAGTGTGCT	TATGCTAGAA	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	14041												14160
628	AGTTTGAAAT	GATTTCTTTT	GGGATGTTAA	GCAAGAAACA	ACTTTTGCTT	TTCATTGCAA	TCTTTCTTCT	AAGTGACTT	GAGACGCTGG	TTTATATTCA	TTTCTTCGCT	GTTTCTTCTG	
TIGR4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

```

14161
628 GCTCAGGGGT CCAACACTTG GCGGAAGTCA GCAGAGGAAT TTCCCTGTCT TTGATTTTGA CTACCTCAGT TTTTGGCCCC ATCCAGGAGG AACTCATTTT CAGAGGACTT CTTCAAGGTG 14280
TIGR4 .....

14281
628 CGGTTTTTGA CAATCTCTGG TTAGGGCTTG TGCTAACTTC CTCTCTCTTT TCTTTCATGC ATGGACCTTC TAATGTCCCT TCGTTTATTT TTTATCTACT TGGGGGTTTG TCGCTGGGCT 14400
TIGR4 .....T.....

14401
628 TTGCTTATAA AAAGAGTCAA AACCTACGGG TTTCTACTCT AGTCCATATG CTTTACAACA GTTGCCCACT CTTATATTAT TTATAA 14486
TIGR4 .....T.....

```

## A2 *S. pneumoniae* 632 gegen *S. pneumoniae* F4

Alignment der Nukleotidsequenz von *S. pneumoniae* 632 gegen *S. pneumoniae* F4. Gleiche Nukleotide sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet, nichtvorhandene durch einen Bindestrich (-) und Unterschiede sind fett hervorgehoben.

```

1
632 TCCA AAACCATACT TATAAGAAAG GTCATCAAAT TCAATATCGC CCATCAAAAA ATGTGAATGA 120
F4 AGGCTAACCT TATCTCCTTG TTTAATCGTG AGATTAATAT CTGTTAAGGT ATCTCA....

121
632 ACAGGGTTTT CTTGAACTTG AAATTCAGAT TCGACTAGAT AGACTTCGTT CAAACGGTTA TTAGCGACCT TCGCAGATTG GAGTTTGTT TGGAGGTTGA TAATATTTTC CATAGGAGTT 240
F4 .....

241
632 GTAAAGTAAG AAAAAAGTGT GTTAAAGGTA ATCAGCTGAC CGATAGAAAT TTTACTCGAC ATGACTAATT GAGCGCCAAA CCATAGGATA AGGATATTCA GAACTAATTT TGTTCCTGTC 360
F4 .....T.....

361
632 TTTAAACTCG TTTGTAAAT AGAATATTTA CTGAGCTTAA AGGATTTTTT CAAATAATCT ACAAATTCGC TGTCTATATT TTGATAGCGA TTTTCTTCAC TCGTGAGCGA CTTTATAGTT 480
F4 .....

481
632 TCAATCCCGT TGATATCTTC GATAATGGCA GAGCTAACCA TAGAATTACT TTGCATGACA TCATGGTTCA TTTTTCGAA AGGTTTCATA AAAGAAAAGA TGATGAACAT GTATATAGGA 600
F4 .....

601
632 ATGGAATAA GAGAAAGAAG GAAGAGATTA GGGTTTGTG CCAGTAAGAC GCCTCCTACA AGAATCAGAA TAGAAACATC CAGAAAAAGA GAAAGAATGG TAGAAGCCAA GGCATCTATA 720
F4 .....

721
632 ATAGAGTTAG CATCTGTGAA TCGTGAAATG ATTTCTCTG TACGACGTGT CGCAAAGAAA GACATGGGAA GTTCAAAAAT ATGGCGAATA TAGGATAAAA TCACATCAAT ACTTAATCTC 840
F4 .....

```

	841											960
632	TGACTCAGAA	CGGTTAGGAG	ATAATCTCTG	GAGAAGCTCA	TGACTTGTTG	GAGGATATAG	GTGATAACCA	GACCAACTGA	GATGATTCCCT	AAAGTTGATT	TTCATCTGAT	TTGGAATGTA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	961											1080
632	TTCATCCAAG	ATTCCCTTGA	GATAGTAAGA	ACCACCTATA	TTGATAATAG	TGACCAATAA	GCTTGAGAGA	ACAATGTAAG	CAATGAGAGA	TTTTTGTTTG	AAAATCAGAG	GAAGGAAGCT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1081											1200
632	TGCTTAGTAG	ACCATTCTTT	TTATCTTTAT	GGGGTTGATA	GCTGGGTTTG	GTAGCTAGAA	AAATAGCTAC	TCCAGTCCAT	TCATAGAAAA	AGCGTTCTTT	TGACATTTTA	GTGATTTTTA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1201											1320
632	CAGAAGGGTC	AGGATCACCA	ATAATCAGAT	AGTCTTTCTT	TGTTTGATAG	ACAACATAGT	AATGTTGGAG	TTTCCTTCT	TTGTTAACGT	GAACGATAAA	TGGATAGGGG	ACATCACTCA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1321											1440
632	TGTCAAAGAG	CGTTTTATCT	GCTTGAACAG	GTCTTGTTTC	AAAGCCCATT	TCATCAGCGG	CTTTTACAAT	GCCAAGAGCA	GTCGTCCCTT	CTTTATTGGT	CTTTGCAAGT	TCTCTCAAGT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....
	1441											1560
632	GAGCTAGAGA	AAAATCTGAA	CCATAGAATT	TAGCAATCGA	GGCTAAGGCA	GCGACACCAC	AGTCTCTCGC	ATCTATTTGA	GGAACAAATG	TACGTTTATA	AGAAGTCATT	GGCAATTCCT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1561											1680
632	TTCATATAGT	GGATAGGTCT	ATTATGTCAT	AAAAC TAAGT	TCATATTTTA	TGAAATCTTG	AATAGTCATT	AAAAC TTCCT	GAATGGTAAA	AAAGTGATTA	GAAATTATTT	TTTTTAAACA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1681											1800
632	TTTAGAGGTG	GCTTGAAATA	AAAAACCTAA	TTCAAGACGT	TTCGATGACA	ATTCAAGATC	TGGATGAAAA	ATTTTAAAAA	ACGATGATAT	ACTAAACTTA	TCAAAGTTAC	AACAAGACAA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1801											1920
632	AAATAAAAAA	AGAAAAAAGG	AGTATTTGTC	ATGAATACAA	AAATGATGGA	ACAATTTTCT	GTTATGGATA	ATGAAGAACT	CGAAATAGTT	AGTGGAGGAA	GAGGCAATTT	AGGATCTGCA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1921											2040
632	ATCGGTGGTT	GTATTGGAGC	AGTACTATTA	GCTGCTGCGA	CTGGTCCGAT	AACTGGGGGA	GCAGCAACAC	TTATTTGTGT	AGGTTCAGGA	ATTATGTCCT	CTTTGTAAGA	TTATGATTCT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2041											2160
632	TAAATATAGT	ATTATTATCG	CTATTAATTT	ACTGTCTTAT	TTACTTACTT	ACAAAATATC	AAAGTTATCT	AAGAATCATG	AGAATAAGAT	AGTTAGCAAA	ATTTTAATTA	TATTATCAAT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2161											2280
632	CGTTTATGTA	ATCGTTGATG	CTTTACTTAG	TTGATGGATT	GGTAGGAATA	AAAAACTTAA	CTATAAACTA	TTATTTACTA	ATATTTTTTG	CTTTCTGCAA	GTTAATAAAT	AGTATAGTAA
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	2281											2400
632	AACTTTTAT	TGCAAGGAGA	ATAACGAAAT	TAAGATATTT	TAGATACTCA	AGATTATTGA	AATCTTAGAC	TAAAAAATAG	GTAAGTCTAC	CTTTAAGAAG	ATAGTAGACG	TATATACTTT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2401											2520
632	TTTAAGAAAA	TCAAAAAGAT	ACTAAAAAAA	ATCTATTTGT	TTATTGAATT	TAAGACTTTG	GTAACAAATT	GAAAAATAAA	AGGAGGTATT	CATCATGAAT	ACAAAAATGT	TGTCACAGTT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2521											2640
632	AGAGTTTATG	GATACTGAAA	TGCTTGCGAA	AGTTGAAGGG	GGGTATAGCT	CCACTGATTG	TCAAAATGCA	CTGATTACAG	GAGTCACTAC	GGGAATTATA	ACTGGTGGAA	CTGGAGCAGG
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2641											2760
632	TTTGCCACT	TTAGGAGTAG	CTGGACTTGC	TGGTGCATTT	GTTGGAGCAC	ACATTGGTGC	AATTGGGGGT	GGATTAAACAT	GCTTAGGAGG	TATGGTTGGT	GATAAATTGG	GAATAAGTTG
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2761											2880
632	GTAAGACTTA	TAGTAAATTT	ATGAGGATTC	TATTCTGATT	TATTTTAGTT	TTTAAAAAAA	GGAGTATTTG	TCATGGATAC	AAAAATGATG	TCACAATTTT	CTGTTATGGA	TACTGAAATG
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2881											3000
632	CTTGCTTGCG	TTGAAGGTGG	CGGATGCAAT	TGGGGAGATT	TTGCCAAAGC	AGGTGTTGGA	GGAGCAGCTG	TAGTTGCTGC	TTTAGGTTGT	GCAGCGGGTG	GAGTGAAATA	TGGGAAAATT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3001											3120
632	CTAGGACCAT	GGGGCGCTGC	AATAGGAGGA	ATTGGAGGAG	CAGTGGTTTG	TGGATATTTA	GCCTATACCG	CTACATCATA	AAAATGAAAG	CTAAATTTTA	TGAAGGCTAT	ATTCTTTTAT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3121											3240
632	ATTCTCTTCG	CTTTTCAAAC	CTATCTTATT	TATCTATCCA	TAAGTATCTC	TGATAAAAAA	CAAAAGACTA	TTGAATTAAC	ATCATTGAAT	TGTTTTGTCA	TATTATTTCT	AATCTATGAT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3241											3360
632	AAATTAATTT	TTCTCTTTAT	TGCCTATGTT	TTTTTGATAA	TTTTTATATT	AACTTGTTTC	CGTAACTGAA	AAGTGACATA	CTATATGAAT	ACAAAAATGA	TGTCACAATT	TTCTGTTATG
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3361											3480
632	GATAATGAAA	TGCTTGCTTG	CGTTGAAGGT	GGAGATATTG	ATTGGGGAAG	AAAAATTAGT	TGTGCAGCAG	GGGTTGCATA	TGGCGCAATT	GATGGGTGTG	CAACAACGGT	TTGACATTTT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3481											3600
632	TATTGGGACC	ATTTGCTATA	GGAATAGGTG	TAAGTGGTGC	TGCAGGTGGA	GCTATACTTG	GAGGTGTAGC	CTATGCAGCA	ACATGTTGGT	GGTAATTATG	GATTTTAAAA	GTTTTATTAT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	3601											3720
632	TGGTTTAGTA	GTTGGTATAT	TTGGTCCTTA	TATGGATGAC	TTAATTAGAA	AAATATTTTC	AAAATCTTCC	AAAAAGGATA	CGGATAGTAC	TCTCTAAAAA	ATAAATTCTT	CCCCTGTATT
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	3721												3840
632	TGCTAGCTTA	ATTTACAGGG	GAGTTTCTTT	AATATTGTTT	CGCCTGTCAA	AATGATATGT	GATAGCAGGA	TGAAAAGTCT	ACAAACAAGT	TGGTATCAAT	ACAATATAAA	GAGGAAAGTA	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3841												3960
632	TGTTTTTCAT	GCTTGCTTTT	TTAATTTTAA	CAATTCAAGA	GGTTTTGATG	ACCATTTATG	ATTTGAGTGA	TCCAAGGTCA	AAATAAGTGC	TATACTAGCA	GTGTAAATGT	TCTTGCTCAA	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	3961												4080
632	CTAAGATAAA	TCGCACATTT	AGGAGGAAAA	CTTATGAAGA	AAAAAATACT	GATTATTTTC	GTTCTGTATC	TGATCATGTC	CATCTTTCTT	TATCCGCTTA	GGGAGAGTAT	TTGGTATAAT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4081												4200
632	CTATTTTATA	CCATAGCCTA	TATGATTGCG	GTTATGATCT	ATTTTCTCTT	AATTAAAAAG	AAAGAAAAGA	AATGAAAGAT	TTTCTTGATT	AAAAAGAATC	ATATTCTTTG	TGAGATTGTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4201												4320
632	CCTGGGTCAG	TTGCCTTTGC	TTGTTTCTAC	TTATCTATTT	CTATTTTCGT	AGTTTTCCTA	TTTCTTTTAG	TAGTTATTAA	CTTGACTTCT	ATTTTGTTTA	CTGTTTATCT	TACTAGGGAA	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4321												4440
632	ATGAGATTAA	GAGAGTTTGA	AGATGATGAT	TTGGTTAGTC	CTAGAACCAA	TCAACTCATG	TTTATCGGCT	TGACAGGCTT	TATGTCTATT	ATTTGTTTGT	ATAGAGGTAT	CACAGCAGGA	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4441												4560
632	GAATCTTATC	AACAACATA	CGCTTATATT	GGTGCTATTC	TTTGCTTGAT	CATCATGCTT	CTACTCATTT	GGGGTTTGAA	GTATTATAAA	AAGTAGGGGC	TAATGAAGTT	TTTGCAATTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4561												4680
632	AGGAGGTTTC	GATGACAATT	CAAGATTGCG	ATGAAAAATT	TTAAAAACA	ATGATATACT	AAACTTGTC	AAGTTGCAAC	GGGTGCTGCT	ACATTATGTT	AAAAATCGCT	CTTGATTGAT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4681												4800
632	AAGTTGGATT	TGTTAGGAAA	GGAGTAAATA	ATTATGGATA	AGAAAAAGAT	AGTTTCGACT	ATAATATGTA	TAGTATTTCT	TGTAGTGTCA	GATAGATAAT	TTTTTAGAGA	CTTAACCCCG	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4801												4920
632	TTACTGTTCA	TTTTAAATAT	TATTGGCCTG	TCTTGCTTTT	CAGTGCTAAC	ATACATTAA	ATAAAAGAGA	TACTCTTAAA	TATAAGTAAA	TGATGATTTG	GTTAGTCCCT	GAACCAATCA	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	4921												5040
632	ACTTATGTTT	ATCGGCTTGG	CAGATTTTAT	GTTTGTGCTT	TGTTTGTATA	GAGGTATTTT	AGAAACAGAA	TTCTATCAAC	AACTAATCGC	TTATATAGGT	GTATTCTCTG	CTTGTTTATC	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5041												5160
632	ACGCTTCTGC	TCATGTGGGG	CTTGAAGTAT	TATAAAAAGT	AGCTTTCTAT	CCTTTTCTGA	CAGGATATTT	GAGTAGAAGG	CTCTATTAAA	TTGTTAGTGA	AATAAATGAA	TGGAGGTATT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	

	5161												5280
632	TAATATGAAA	TACAGATTAT	TTTTTGTTAT	TTTCTTGAGT	AGTGTGTTGG	ATATTCTTTT	AGGGACATTT	TTACAAATCT	CTATCGTATC	TATTGGGTGG	CTTGTTCTTT	ACAGTGGTTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5281												5400
632	GTTTGAAGCA	GGAGTTTTCC	TTCTTGCTAA	TAAAGGGGTG	GCGGTAAAAA	TCAAGGAAGT	AGATATTCTGA	AATCGCTTTA	AATTTATTTT	TGAAAAAACC	TTATGGTTTC	AAATTCTTTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5401												5520
632	GCTCATCTTT	TTGATAATCA	AACTTTATCT	TGGTTTGGAT	GCGAGGTTGA	TTTTATTCTA	TGGACATATT	TTCATTGTCT	TTAATGCCTT	AATGTATCTA	TTATCTAGTA	GTCAGGTTAG	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5521												5640
632	CCTTAAAAAA	AACAAACTGT	CTTCTTAATC	TTACAGCAGT	AGAGCCTGAC	AAGGTGAGGT	CATAGTAGGG	AGGATTCTTA	TGAAAAAGTA	TCAACTTCTA	TTCAAAATAA	GTGCAGTTTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5641												5760
632	CTCTTACTTA	TTTTTCGTAT	TTGGTCTTTC	TCAGATGACG	CTTATTATTC	AAAATTATTG	GCAATTTTCT	TCCCAGATTG	GCAATTTCGT	CTGGATTCAA	AATTTCCTGA	GTTTGCTATT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5761												5880
632	TAGCGGAGTC	ATGATTTGGA	TTCTGGTTAA	GACAGGTCAT	GGTTATCTCT	TTCACATTCC	AAGAAAAAAA	TGGCTTTGGT	ATTCGATTTT	GACAGTATTA	GTGGTAGTGC	TCCAGATCTC	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	5881												6000
632	TTTTAACGTT	CAGACAGCTA	AACATGTTCA	GTCAACTGCT	GAAGGTTGGG	CTGTATTGAT	CGGTTATAGT	GGGACCAACT	TTGCTGAGCT	AGGTATCTAT	ATAACTTTGT	TCTTCTGAC	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G	.....	
	6001												6120
632	TCCACTTATG	GAAGAGCTAA	TCTATAGAGG	ATTACTGCAA	CACGCCTTTT	TTAAGCATTC	GAGATTTGGC	CTTGATTGTC	TTCTCCGTC	AATTTTATTT	GCTCTTCCTC	ATTTTCAAG	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6121												6240
632	CCTGCCTAGT	TTGTTAGATA	TCTTCATCTT	TGCAACATCT	GGCATCATCT	TTGCTAGTTT	GACCCGCTAT	ACCAAGAGCA	TTTATCCTTC	CTATGCGGTG	CATGTGATCA	ATAATATTTT	
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	6241												6360
632	CGCAACATTA	CCATTTTTGC	TGACTTTTTT	ACATAGGGTC	TTGGGGTAAA	AAAACAAAAG	GCTTGCTTTT	CAGCCAT					
F4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....AGA	GGAGATCATC	ATGTATAAAC	ACTTATTTTT	CCTAGATTCC	
	6361												
632	AAAACTTTA												
F4	AAAACTTTA												



## B. Identifizierte Genprodukte in den sequenzierten DNA-Abschnitten

### B1. Homologien der abgeleiteten Peptidsequenzen aller ORFs des Stammes *S. pneumoniae* 2306 zu *S. pneumoniae* R6 und TIGR4.

2306		R6				TIGR4			
Name	Länge	Gen	Länge	Identität <sup>1</sup>	Ähnlichkeit <sup>1</sup>	Gen	Länge	Identität <sup>1</sup>	Ähnlichkeit <sup>1</sup>
SpiR1	107	Spr0462	112	104/107 (97 %)	106/107 (99 %)	BlpS; SP_0525	112	100/107 (93 %)	105/107 (98 %)
SpiR2	245	Spr0463	245	238/245 (97 %)	240/245 (97 %)	BlpR; SP_0526	245	245/245 (100 %)	245/245 (100 %)
SpiH	446	Spr0464	446	446/446 (100 %)	446/446 (100 %)	BlpH; SP_0527	446	379/446 (84 %)	401/446 (89 %)
SpiP	51	Spr0465	51	51/51 (100 %)	51/51 (100 %)	BlpC; SP_0528	42	29/32 (90 %)	31/32 (96 %)
SpiD2	311	Spr0466	335	310/311 (99 %)	311/311 (100 %)	SP_0529	453	302/311 (97 %)	307/311 (98 %)
SpiD1	111	Spr0467	111	111/111 (100 %)	111/111 (100 %)	SP_0529	453	109/111 (98 %)	109/111 (98 %)
SpiBC	517	Spr0468	541	516/517 (99 %)	516/517 (99 %)				
SpiA	195	Spr0469	197	193/195 (98 %)	193/195 (98 %)				
PncR	67	Spr0470	77	20/23 (86 %)	20/23 (86 %)	BlpI; SP_0531	65	17/23 (73 %)	19/23 (82 %)
						BlpJ; SP_0532	89	17/28 (60 %)	20/28 (71 %)
						BlpO; SP_0541	49	18/23 (78 %)	21/23 (91 %)
						BlpR; SP_0533	76	18/23 (78 %)	20/23 (86 %)
PncS	68								
PncT	67								
PncG	54					SP_0535	54	49/54 (90 %)	51/54 (94 %)
IS1381	86	Spr0993	235	84/86 (97 %)	84/86 (97 %)	SP_1310	132	83/86 (96 %)	84/86 (97 %)
		Spr1946	189	82/85 (96 %)	83/85 (97 %)				
		Spr1076	173	82/86 (95 %)	83/86 (96 %)				
IS1381	46								
IS1381	158	Spr1078	132	124/132 (93 %)	1226/132 (95 %)	SP_1195	129	109/117 (93 %)	111/117 (94 %)
		Spr1573	129	107/117 (91 %)	109/117 (93 %)				
		Spr0994	129	108/117 (92 %)	110/117 (94 %)				
PncI	84					BlpM; SP_0539	84	83/84 (98 %)	83/84 (98 %)
PncJ	67					BlpN; SP_0540	67	67/67 (100 %)	67/67 (100 %)

PncK	69		69	69/69 (100 %)	69/69 (100 %)				
PncW	77	Spr0470	77	76/77 (98 %)	77/77 (100 %)	BlpO; SP_0541	49	19/25 (76 %)	21/25 (84 %)
PncO	229	Spr0472	229	229/229 (100 %)	229/229 (100 %)	BlpY; SP_0545	229	214/229 (93 %)	217/229 (94 %)
PncQ	77	Spr0473	77	77/77 (100 %)	77/77 (100 %)	BlpZ; SP_0546	77	77/77 (100 %)	77/77 (100 %)
PncP	203	Spr0474	203	203/203 (100 %)	203/203 (100 %)	SP_0547	203	199/203 (98 %)	200/203 (98 %)

<sup>1</sup> Die Zahlen beziehen sich auf die mit BLAST aufgegriffene Region.

## B2. Übersicht der identifizierten open reading frames

Angegeben ist Start und Ende des Gens auf dem sequenzierten DNA-Fragment, Länge in Nukleotiden (bp) und Aminosäuren (aa), Proteinname und Beschreibung. Sowie die Anzahl der Transmembranhelices (THMs), isoelektrischer Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW) des Genproduktes in Dalton [Da]. Bei Bacteriocinen und Peptidpheromonen sowohl von Pre- und dem prozessierten Propeptid in Klammern.

### B2.1 *S. pneumoniae* R6

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
102	440	338	112	SpiR1	8,77 / 13464		Regulatorprotein
445	1182	737	245	SpiR2	6,16 / 28755		Responseregulator
1192	2536	1340	446	SpiH	5,73 / 51825	6	Histidinkinase
2578	2733	128	42	SpiP	5,13 / 5917 (5,57 / 3237)		Peptidpheromon, Glycin-Glycin Spaltstelle
2790	3725	1361	453	SpiD	5,74 / 50528	1	Pheromon-Transportprotein
3816	4151	570	189	SpiC	7,10 / 21362		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, ATPase-Domäne
4162	5715	890	296	SpiB	5,27 / 33665	3	ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, Permeasedomäne
5732	6319	578	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
6609	6842	233	77	PncW	6,70 / 8622		
6874	7563	689	229	PncO	9,82 / 26219	7	CAAX Protease
7605	7838	233	77	pncQ	6,51 / 8753	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
7989	8600	611	203	PncP	7,90 / 22686	4	CAAX Protease, ATP Bindedomäne

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## B2.2 *S. pneumoniae* TIGR4

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
574	912	338	112	SpiR1	8,77 / 13464		Regulatorprotein
917	1654	737	245	SpiR2	6,16 / 28755		Responseregulator
1668	3008	1340	446	SpiH	5,73 / 51825	6	Histidinkinase
3079	3207	128	42	SpiP	4,90 / 4935 (5,32 / 2255)		Peptidpheromon, Glycin-Glycin Spaltstelle
3264	4625	1361	453	SpiD	5,74 / 50528	1	Pheromon-Transportprotein
4636	5205	570	189	SpiC	7,10 / 21362		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, ATPase-Domäne
5299	6189	890	296	SpiB	5,27 / 33665	3	ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, Permeasedomäne
6206	6793	578	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
7075	7272	197	65	PncA	4,25 / 6374 (8,07 / 3773)	1	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
7277	7438	161	53	PncB	9,40 / 6011	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
7422	7592	170	56	PncC	10,35 / 6737	1	Protein, hypothetisch
7739	8008	269	89	PncD	4,58 / 8661 (5,21 / 6123)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
8077	8307	230	76	PncE	4,86 / 7593 (8,86 / 5055)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
8229	8429	200	66	PncF	8,97 / 7563	1	Protein, hypothetisch
8726	8890	164	54	PncG	9,87 / 6556.15	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
8887	9291	404	134	PncH	9,69 / 15594	4	Protein, hypothetisch
9494	9883	389	129	IS1381	9,39 / 14849		Transposase
9909	10298	389	129	IS1381	10,33 / 14672		Transposase
10448	10702	254	84	PncI	4,43 / 8495 (6,05 / 5868)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
10718	10921	203	67	PncJ	5,89 / 6491 (8,83 / 4154)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
10940	11149	209	69	PncK	9,25 / 8284	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
11165	11314	149	50	PncV	4,09 / 5135 (4,43 / 2614)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
11205	11537	332	110	PncL	8,92 / 12694	1	Membranprotein
11872	12051	179	59	PncM	8,74 / 6733.26	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
12308	12706	398	132	PncN	9,94 / 15241	4	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
12758	13447	689	229	PncO	9,82 / 26219	7	CAAX Protease
13489	13722	233	77	pncQ	6,51 / 8753	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
13873	14484	611	203	PncP	7,90 / 22686	4	CAAX Protease, ATP Bindedomäne

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

### B2.3 *S. pneumoniae* 628

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
54	392	338	112	SpiR1	8,77 / 13464		Regulatorprotein
397	1134	737	245	SpiR2	6,16 / 28755		Responseregulator
1148	2488	1340	446	SpiH	5,73 / 51825	6	Histidinkinase
2687	2559	128	42	SpiP	4,90 / 4935 (5,32 / 2255)		Peptidpheromon, Glycin-Glycin Spaltstelle
4105	2744	1361	453	SpiD	5,74 / 50528	1	Pheromon-Transportprotein
4685	4116	570	189	SpiC	7,10 / 21362		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, ATPase-Domäne
5669	4779	890	296	SpiB	5,27 / 33665	3	ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, Permeasedomäne
6273	5686	578	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
6555	6752	197	65	PncA	4,25 / 6374 (8,07 / 3773)	1	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
6757	6918	161	53	PncB	9,40 / 6011	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
6902	7072	170	56	PncC	10,35 / 6737	1	Protein, hypothetisch
7219	7488	269	89	PncD	4,58 / 8661 (5,21 / 6123)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
7557	7787	230	76	PncE	4,86 / 7593 (8,86 / 5055)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
7709	7909	200	66	PncF	8,97 / 7563	1	Protein, hypothetisch
8207	8371	164	54	PncG	9,87 / 6556	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
8368	8772	404	134	PncH	9,69 / 15594	4	Protein, hypothetisch
8975	9364	389	129	IS1381	9,39 / 14849		Transposase
9390	9779	389	129	IS1381	10,33 / 14672		Transposase
9929	10183	254	84	PncI	4,43 / 8495 (6,05 / 5869)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
10199	10402	203	67	PncJ	5,89 / 6491 (8,83 / 4155)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
10421	10630	209	69	PncK	9,25 / 8284	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
10646	10795	149	50	PncV	4,09 / 5135 (4,43 / 2614)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
10686	11018	332	110	PncL	8,92 / 12694	1	Membranprotein
11353	11532	179	59	PncM	8,74 / 6733	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
11789	12187	398	132	PncN	9,94 / 15241	4	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
12240	12929	689	229	PncO	9,82 / 26219	7	CAAX Protease
12971	13204	233	77	pncQ	6,51 / 8753	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
13355	13966	611	203	PncP	7,90 / 22686	4	CAAX Protease, ATP Bindedomäne

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## B2.4 *S. pneumoniae* F4

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
944	54	890	296	SpiB	5,27 / 33665	3	ABC Transporter, Permeasedomäne
1548	961	587	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
1830	2027	197	65	PncA	4,25 / 6374 (8,07 / 3772)	1	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
2032	2193	161	53	PncB	9,63 / 6033	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
2177	2347	170	56	PncC	10,35 / 6737	1	Protein, hypothetisch
2493	2762	269	89	PncD	4,58 / 8661 (5,21 / 6123)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
2831	3079	248	82	PncU	4,86 / 7971 (8,59 / 5447)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
3098	3307	209	69	PncK	9,25 / 8284	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
3323	3472	149	50	PncV	4,23 / 5150 (4,43 / 2614)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
3363	3695	332	110	PncL	8,92 / 12694	1	Membranprotein <sup>2</sup>
3992	4153	161	53	PncG	9,87 / 6574	2	Immunitätsprotein
4319	4534	215	71	PncH	7,75 / 8238	2	Protein, hypothetisch
4712	4891	179	59	PncM	8,74 / 6733	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
5148	5546	398	132	PncN	9,94 / 15241	4	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
5598	6287	689	229	PncO	9,73 / 26367	6	CAAX Protease

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## B2.5 *S. pneumoniae* 632

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	Aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
1	825	824	275	SpiB	5,13 / 31406	2	ABC Transporter, Permeasedomäne
1493	906	587	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
1775	1972	197	65	PncA	4,25 / 6374 (8,07 / 3772)	1	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
1977	2138	161	53	PncB	9,63 / 6033	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
2122	2292	170	56	PncC	10,35 / 6737	1	Protein, hypothetisch
2439	2708	269	89	PncD	4,58 / 8661 (5,21 / 6123)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
2777	3025	248	82	PncU	4,86 / 7971 (8,59 / 5447)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
3044	3253	209	69	PncK	8,85 / 8014	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
3269	3415	146	50	PncV	4,23 / 5150 (4,42 / 2614)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
3309	3641	332	110	PncL	8,92 / 12694	1	Membranprotein <sup>2</sup>
3938	4099	161	53	PncG	9,87 / 6574	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
4265	4480	215	71	PncH	7,75 / 8238	2	Protein, hypothetisch

4658	4837	179	59	PncM	8,74 / 6733	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
5094	5492	398	132	PncN	9,94 / 15241	4	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
5544	6233	689	229	PncO	9,73 / 26415	6	CAAX Protease

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## B2.6 *S. pneumoniae* Hu15

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
383	580	197	65	PncA	4,25 / 6362 (8,07 / 3760)	1	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
585	746	161	53	PncB	9,40 / 6011	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
730	900	170	56	PncC	10,35 / 6737	1	Protein, hypothetisch
1047	1316	269	89	PncD	4,58 / 8661 (5,21 / 6123)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
1385	1615	230	76	PncE	4,86 / 7579 (8,86 / 5054)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
1537	1737	200	67	PncF	8,97 / 7623	1	Protein, hypothetisch
2033	2197	164	54	PncG	9,87 / 6556	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
2194	2598	386	128	PncH	9,39 / 15834	4	Membranprotein <sup>2</sup>
2666	3064	398	132	PncN	9,94 / 15241	4	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
3116	3805	689	229	PncO	9,66 / 2639	6	CAAX Protease

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## B2.7 *S. pneumoniae* 2306

Start <sup>1</sup>	Ende	bp	aa	Protein	pI / MW [Da]	TMHs	Beschreibung
102	425	323	107	SpiR1	9,73 / 12996		Regulatorprotein
445	1182	736	245	SpiR2	6,16 / 28755		Responseregulator
1196	2536	1340	446	SpiH	5,51 / 51670	6	Histidinkinase
2733	2578	155	51	SpiP	5,13 / 5917 (5,57 / 3237)		Peptidpheromon, Glycin-Glycin Spaltstelle
3725	2790	935	311	SpiD2	6,25 / 34493		Pheromon-Transportprotein
4151	3816	335	111	SpiD1	5,61 / 12608	1	Pheromon-Transportprotein
5715	4162	1553	517	SpiBC	6,65 / 58393	3	ABC Transporter, ATP-Bindedomäne, Permeasedomäne
6319	5732	587	195	SpiA	9,27 / 22271		ABC Transporter, Peptidprozessierung und Transport, C39 Proteasedomäne
6609	6812	203	67	PncR	4,47 / 7594 (4,66 / 4947)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
6721	6812	206	68	PncS	9,57 / 7875	1	Protein, hypothetisch
7130	7333	203	67	PncT	4,29 / 7147 (6,01 / 4911)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
7907	8071	164	54	PncG	10,00 / 6541	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
8336	8596	260	86	IS1381	9,69 / 10057		Transposase
8669	8809	140	46	IS1381	9,90 / 5218		Transposase
8740	9216	476	158	IS1381	9,79 / 18419		Transposase
9288	9542	254	84	PncI	4,64 / 8451 (8,03 / 5825)		Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
9558	9761	203	67	PncJ	5,89 / 6491 (8,83 / 4155)	2	Bacteriocin, Glycin-Glycin Spaltstelle <sup>2</sup>
9780	9989	209	69	PncK	9,25 / 8284	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
10005	10238	233	77	PncW	6,00 / 8623		Protein, Fusion mit einer Bacteriocin-Leadersequenz, hypothetisch
10270	10959	689	229	PncO	9,82 / 26434	6	CAAX Protease
11001	11234	233	77	PncQ	6,51 / 8753	2	Immunitätsprotein <sup>2</sup>
11385	11996	611	203	PncP	6,57 / 22800	4	CAAX Protease, ATP Bindedomäne

<sup>1</sup> ATG von SpiR1 wurde (1) gesetzt

<sup>2</sup> mögliches Gen

## C. Sonstiges

### C1. Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
AS / AA	Aminosäuren; Aminoacid
NT	Nukleotid
ORF	Open reading frame; offener Leserahmen
TMH	Transmembranhelix
pI	Isoelektrischer Punkt
RT	Raumtemperatur
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
TCS	Two-Component System; Zwei-Komponenten-System
CSP	competence stimulating peptide
QS	Quorum sensing
AIP	Autoinducing peptid
spi	<i>S. pneumoniae</i> peptide induction
pnc	pneumococcal bacteriocins
blp	bacteriocin-like peptide

### C2. Verwendete Chemikalien

Hersteller der verwendeten Chemikalien soweit nicht im Text erwähnt.

Medienkomponenten und Chemikalien	Hersteller
Trypton (Pancreatic Digest of Casein)	Difco
Hefeextrakt (Extrakt autolysierter Hefezellen)	Difco
NaCl p.A.	Merck KgaA, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat p.A. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	AppliChem
Agar-Agar	Serva Feinchemica GmbH & Co., Heidelberg
$\alpha$ -D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Galaktose	Merck, KgaA, Darmstadt
Bactopepton (Enzymatic Digest of Protein)	Difco
Neopepton (Enzymatic Digest of Protein)	Difco
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Trishydroxymethylaminoethan p.A. (Tris)	AppliChem
Phenol	Roth
Chloroform	AppliChem
Isoamylalkohol	Roth
Essigsäure <sub>konz.</sub>	Roth
NaOH <sub>konz.</sub>	Sigma
HCl <sub>konz.</sub>	J.T. Baker
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galatosid	Roth
N,N'-Dimethyl-Formamid	Merck
Ethanol vergällt	Chemikalienausgabe Universität Kaiserslautern